

hnRNP-Proteine der A- und C-Klasse: Vom Protein zur DNA

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der Abteilung Chemie
an der Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von

HELMUT WERR

Bochum, Juli 1988



ANNUAL REPORT OF THE BOARD OF DIRECTORS
FOR THE YEAR 1904

THE BOARD OF DIRECTORS
OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA
HAS THE HONOR TO ANNOUNCE
TO THE STOCKHOLDERS
AND THE PUBLIC
THE RESULTS OF THE YEAR 1904

UNIVERSITY OF CALIFORNIA
BERKELEY, CALIF.

PUBLISHED BY THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA PRESS



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543113_0024

hnRNP-Proteine der A- und C-Klasse: Vom Protein zur DNA

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der Abteilung Chemie
an der Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von

HELMUT WERR

Bochum, Juli 1988

Prüfungsausschuss der A- und C-Klassen
Vom Protein zur DNA

ABSTRAKT

Zur Erhellung der Frage, ob die
DNA die Information für die
Proteinbiosynthese enthält,
wurde die DNA von *Escherichia coli*
in *Salmonella typhimurium* eingeführt.

Wissenschaftler

HELMUT WILHELM

Tag der mündlichen Prüfung: 28. 9. 1988

1. Prüfer: Prof. Dr. K.P. Schäfer
2. Prüfer: Prof. Dr. O. Pongs
3. Prüfer: Prof. Dr. G. M. Schneider

Bochum, 1988

Ich danke Prof. Dr. K. P. Schäfer, Byk Gulden, Konstanz, für seine Betreuung und seine Diskussionsbereitschaft.

Prof. Dr. O. Pongs danke ich für sein Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

Ich danke G. Multhaup und Prof. Dr. K. Beyreuther, damals Universität zu Köln, für die Sequenzierung der Peptide, weiterhin U. Bonas und H. Sommer, MPI Köln-Vogelsang, für die Unterweisung in die Herstellung der in vitro Verpackungslysate und Prof. Dr. A. Alonso, DKFZ Heidelberg, für seine anfängliche Hilfe bei der cDNA-Klonierung.

Desgleichen gilt mein Dank H. Kleinert, T. Walter und Prof. Dr. B. J. Benecke für ihre Hilfe bei der Durchführung der CAT-Aktivitätsbestimmung.

Besonders hervorheben möchte ich die Zusammenarbeit bei der cDNA-Klonierung mit P. Nalik und ihm hier auch für viele Diskussionen danken.

Zuletzt möchte ich allen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Biochemie danken, die in der einen oder anderen Weise behilflich waren.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Material und Methoden	6
2.1	Materialien	6
2.2	HeLa-Zellkultur	7
2.3	hnRNP-Proteinisolierung, Oligonukleotide	7
2.3.1	Isolierung der hnRNP-Partikel und RNA-Verdauung	7
2.3.2	Trennung der Proteine nach isoelektrischem Punkt und Molekulargewicht	8
2.3.3	V8 Proteaseverdauung einzelner Proteine nach Cleveland et al. (1977)	8
2.3.4	Elektroelution von Proteinen	9
2.3.5	Sequenzanalyse der hnRNP-Proteine	9
2.3.6	Oligonukleotidsynthese	9
2.4	Isolierung von RNA und DNA	10
2.4.1	poly(A*)-RNA-Isolierung	10
2.4.2	Isolierung chromosomaler DNA	10
2.4.3	Isolierung von Plasmid- und λ -DNA	11
2.4.4	Isolierung einzelsträngiger M13-DNA	11
2.4.5	Restriktion von DNA	11
2.4.6	Gelelektrophorese von DNA und RNA	12
2.4.7	Transfer von DNA und RNA auf Nylonmembranen	12
2.4.7.1	Transfer von DNA nach Southern et al. (1975)	12
2.4.7.2	RNA-Transfer zur Northern-Analyse	12
2.5	In vitro Verpackung von λ -DNA	13
2.5.1	Anzucht der Bakterienstämme zur Präparation der in vitro Verpackungslysate	13

2.5.1.1	"Sonic Extract"-(SE)-Lysat	14
2.5.1.2	"Freeze Thaw"-(FTL)-Lysat	15
2.5.2	Testen der SE- und FTL-Lysate	15
2.6	cDNA-Synthese	16
2.6.1	Synthese des 1. Stranges	16
2.6.2	Synthese des 2. Stranges nach Gubler et al. (1983)	17
2.6.3	Methylierungs- und Auffüllreaktion	17
2.6.4	Phosphorylierung der EcoRI-Linker	18
2.6.5	Ligation der cDNA mit Eco RI-Linker und Restriktion	18
2.6.6	Abtrennung überschüssiger EcoRI-Linker-DNA	19
2.6.7	Ligation der cDNA mit den λ -Armen	20
2.6.8	In vitro Verpackung	20
2.6.9	Amplifikation der erhaltenen cDNA-Bibliothek	20
2.7	DNA-Bibliotheken	21
2.8	Ausplattierung der Phagen und Erstellung der Filterabzüge	21
2.9	Isolierung positiver Klone	22
2.10	Markierung von DNA-Fragmenten nach Feinberg et al. (Oligomarkierung, 1983)	22
2.11	Endmarkierung von Oligonukleotiden und DNA-Fragmenten	23
2.12	Hybridisierungen an immobilisierte RNA bzw. DNA und Plaque-Filterabzüge	24
2.13	Isolierung von DNA-Fragmenten und Subklonierung in M13-DNA	26
2.14	Sequenzierung nach Sanger et al (1977)	26
2.15	Sequenzierung mit modifizierter T7-Polymerase Sequenase TM	27
2.16	"Primer-extension"-Reaktion	28

2.17	Bestimmung der Chloramphenicolacetyltransferase-(CAT)-Aktivität	28
2.18	Autoradiographie	29
2.19	Auswertung der DNA-Sequenzdaten	29
2.20	TCA-Fällung von Nukleinsäuren und Bestimmung der Radioaktivität	29
3	Ergebnisse	30
3.1	Isolierung und Sequenzierung von hnRNP-Proteinen	30
3.2	Auswahlkriterien der Oligonukleotide	34
3.3	Northernanalyse	36
3.4	"primer extension"-Versuch an poly(A ⁺)-RNA	38
3.5	Erstellung einer cDNA-Bibliothek	39
3.5.1	In vitro Verpackungsextrakte	39
3.5.2	cDNA-Synthese	40
3.6	Isolierung eines cDNA-Klones für das hnRNP-Protein C3	44
3.7	Sequenz des isolierten cDNA-Klones	46
3.8	Southernanalyse identifiziert Multigenfamilie	48
3.9	Isolierung genomischer Klone für das hnRNP-Protein C3	49
3.10	Charakterisierung des genomischen Klon λ gHW14, λ gHW19 und λ gHW 31	54
3.11	Teilsequenzierung des BamHI-DNA-Fragmentes aus dem genomischen Klon λ gHW 14	55
3.12	Bestimmung der Chloramphenicolacetyltransferase-(CAT)-Aktivität	61
4	Diskussion	64
4.1	Auswahlkriterien für die Analyse einzelner hnRNP-Proteine	64
4.2	Homologie eines hnRNP-Proteins zu DNA-bindenden Proteinen	65

4.3	cDNA-Klonierung	68
4.4	cDNA-Isolierung und Transkriptanalyse	69
4.5	Genomische DNA	72
5	Literatur	76
	Anhang	84

Abkürzungen

A	Adenin
A _{578,260}	Absorption bei 578 bzw. 260 nm
AMV	Avian Myoblastosis Virus
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
β-NAD	β-Nicotinamidadenindinukleotid
b	Basen
bp	Basenpaare
C	Cytosin
cDNA	copy-DNA
Ci	Curie
cpm	Zählimpulse pro Minute
dATP	Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	Desoxycytidin-5'-triphosphat
dGTP	Desoxyguanosin-5'-triphosphat
dTTP	Desoxythymidin-5'-triphosphat
dNTP	Desoxynukleosid-5'-triphosphat (N=A, C, G, T)
ddNTP	Didesoxynukleosid-5'-triphosphat (N=A, C, G, T)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
g	Gravitationsbeschleunigung im Erdfeld
G	Guanin
kb	Kilobasen
kbp	Kilobasenpaare
kD	Kilo-Dalton
LMP-Agarose	"low melting point"-Agarose
MMLV	Moloney Murine Leukemia Virus
mRNA	messenger-RNA
NEPHGE	Nichtgleichgewichts-pH-Gradientenelektrophorese (nonequilibrium pH gradient electrophoresis)
NP 40	Nonident P 40
PAA	Polyacrylamid
poly(dT)	Polydesoxythymidinsäure
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sucrose	Saccharose
T	Thymin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	transfer-RNA
u	Unit, Enzymeinheit
v/v	Volumen pro Volumen
Vol.	Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen



Zusammenfassung

Die Reifung der hnRNA zur translatierbaren mRNA beinhaltet neben einzelnen Modifizierungen des Primärtranskriptes (Kappe, Methylierung und Polyadenylierung) auch das Spleißen der intervenierenden Sequenzen. An diesem Prozeß sind die hnRNA bindenden Proteine, hnRNPs, beteiligt. Die hnRNP-Proteine lassen sich durch eine schnelle und effiziente Methode aus Zellkernen isolieren. Das "core"-Proteingemisch läßt sich zweidimensional (1. Dim. NEPHGE, 2. Dim. SDS-PAA-Gel) in 14 Proteine und entsprechende Ladungsisomere trennen.

Für die Hauptkomponenten A1, A2 und C3 wurden nach Protease V8-Spaltung Peptide isoliert und ansequenziert. Aus den erhaltenen Aminosäuresequenzen konnten anhand des genetischen Codes Oligonukleotide für die Charakterisierung von cDNA- und genomischen Klonen abgeleitet werden.

Für HeLa-poly(A⁺)-mRNA wurde eine cDNA-Bibliothek in dem Phagen gt10 hergestellt.

Mit den Oligonukleotiden konnten cDNA-Klone aus dieser cDNA-Bibliothek isoliert werden. Die Northernanalyse ergab für das Protein C3 2 mRNAs mit einer Länge von 1,4 und 1,9 kb.

Die Ergebnisse von "primer extension"-Analysen weisen auf verschiedene mRNAs hin. Mit Hilfe des isolierten cDNA-Klones sowie der eingesetzten Oligonukleotide wurden 60 genomische Klone aus einer Suche von 360.000 Phagen isoliert.

Ein genomischer Klon λ gHW14 wurde anhand seiner Hybridisierungen mit den Oligonukleotiden zur weiteren Charakterisierung ausgewählt, da er es möglich erscheinen ließ, das Protein C3 intronlos zu codieren. Dieser Klon erwies sich jedoch anhand eines Stoppcodons in dem codierenden Bereich und direkten Wiederholungen von 11 Basen am 5'- und 3'-Ende gegenüber der cDNA-Klon als Pseudogen.

1 Einleitung

In eukaryotischen Zellen ist die Transkription und die Translation im Gegensatz zu bakteriellen Zellen räumlich und zeitlich getrennt. Dabei wird die Genexpression nicht allein auf Transkriptionsebene kontrolliert, sondern auch über Halbwertszeit und Prozessierung der heterogenen nuklearen RNA (hnRNA) im Kern, Transport der reifen mRNA in das Cytoplasma sowie die Stabilität und Komplexierung der mRNA im Cytoplasma. Weitere Möglichkeiten der Kontrolle ergeben sich bei der Translation und schließlich der Aktivität des synthetisierten Proteins über posttranslationale Modifikationen.

Während der Transkription wird die hnRNA als Vorläufer der mRNA (prä-mRNA) synthetisiert. Dieses Produkt wird bereits cotranskriptional am 5'-Ende mit einer Kappe versehen (7mG-5' ppp5' NpN) und an den ersten Nukleotiden methyliert (Shatkin, 1976, Coppola et al., 1983). Posttranskriptional wird sie am 3'-Ende zum Teil polyadenyliert, wobei am 3'-Ende durch Schneiden in der Nähe eines Polyadenylierungssignals ein spezifischer Schnitt gesetzt wird (Darnell, 1982, Birnstiel et al., 1985).

Die hnRNA liegt ausschließlich im Kern vor. Neben Sequenzen (Exons), die in der reifen mRNA gefunden werden, enthält sie zusätzliche Bereiche (Introns), die in der mRNA fehlen (Breathnach et al., 1977, 1981). Diese Introns werden vor dem Kernaustritt der reifen mRNA basengenau aus der prä-mRNA gespleißt, so daß der Leserahmen für die Translation gebildet wird.

Für den Spleißvorgang wird der folgende Vorgang postuliert (Padgett et al., 1986, Sharp, 1987): An der 5'-Introngrenze wird die hnRNA aufgeschnitten, das 5'-Ende des Introns an ein Nukleotid im 3'-Bereich des Introns über eine 2'-5'-Phosphodiesterbrücke verestert, und dann folgt der Schnitt der 3'-Introngrenze. Die beiden freien Exongrenzen werden anschließend verknüpft. Das Intron wird als sogenannte Lasso-("lariat")-Struktur aus der hnRNA entfernt und schnell degradiert.

Die Sequenzen der Introngrenzen und der Verknüpfungsstelle

("branch site") sind konserviert und besitzen Homologien zu kleinen nuklearen RNAs (small nuclear RNAs, snRNAs; snRNA-U1 zur 5'-Grenze, snRNA-U2 zur Verknüpfungsstelle und snRNA-U5 zur 3'-Grenze (Maniatis et al., 1985)).

Sowohl hn- als auch snRNA liegen im Zellkern nicht frei vor, sondern sind mit spezifischen Proteinen assoziiert, die als hnRNP- und snRNP-Proteine bezeichnet werden (Dreyfuß, 1986, Maniatis et al., 1987).

Mittels elektronenmikroskopischer Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß die hnRNA bereits cotranskriptional in fibrillären (7 nm) und partikulären (25 nm, 40 nm) hnRNP-Strukturen verpackt wird (Beyer et al., 1980, Ostheim et al., 1985). Dies läßt unterschiedliche Funktionen und Proteinzusammensetzungen der Partikel vermuten.

An Drosophila-Transkripten kann der Reifungsvorgang sichtbar gemacht werden (Ostheim et al., 1985). Ein 40 nm großer RNA-Proteinpartikel erscheint an den Spleißstellen.

Der geschilderte Reifungsprozeß läuft für Globin- und Ad2-virale prä-mRNA in einem 60S Spleißosom ab (Choi et al., 1986, Bindereif et al., 1986, 1987). Die Bildung dieses 60S-RNA-Proteinpartikels wird durch Antikörper gegen ein hnRNP-Protein verlangsamt und der 5'-Schnitt des Introns vollständig inhibiert (Choi et al., 1986). Antikörper gegen eine Gruppe von hnRNP-Proteinen verhindern in einem Spleißextrakt den Reifungsvorgang (Mayrand et al., 1986, Sierakowska et al., 1986). In diesen Zusammenhang gehört auch, daß eine hnRNP-Proteingruppe bei einem Ad2-viralen Transkript an Intron/Exonübergängen der Sequenz häufiger quervernetzt werden kann (van Eekelen et al., 1982).

Die hnRNP-Proteine sind ebenfalls mit der nuklearen Matrix assoziiert, die am Transport der hnRNA zur Kernmembran beteiligt sein soll (van Eekelen et al., 1981, Verheijen et al., 1988). Man kann sich den Reifungsprozeß der hnRNA so vorstellen, daß an der nuklearen Matrix die mit hnRNP-Proteinen verpackte Nukleinsäure prozessiert wird und unmittelbar der Transport der reifen mRNA zur Kernpore stattfindet. Diese Hypothese wird durch die Beobachtung gestützt, daß Lymphozyten auf ConcanavalinA-(ConA)-Stimulation mit einer Volumenzunahme des Kerns und einer vermehrten Synthese der Matrixproteine reagieren (Setterfield et al., 1983).

Die Prozessierung der hnRNA ist somit ein komplexer Vorgang. Die Betrachtung der einzelnen, am Reifungsprozeß beteiligten Proteine und Nukleinsäuren ergibt zusammenfassend, daß die hnRNP-Proteine unter jedem angeführten Teilaspekt als Bestandteil nachzuweisen sind. Eine genaue Untersuchung dieser Proteine und auch ihrer Gene sollte es erlauben, den komplexen Prozessierungsvorgang der hnRNA zur mRNA besser zu verstehen.

Die hnRNP-Partikel können durch eine pH 8/Diffusionsmethode aus intakten Zellkernen isoliert werden, die als 40S Partikel in einem 15-30%igen Sucrosegradienten sedimentieren (Samarina, 1966, 1968).

Diese hnRNA-Proteinkomplexe bestehen zu 80 % aus Protein und schützen eine etwa 500 b lange RNA vor dem nukleolytischen Abbau (LeSturgeon et al., 1981). Intakte Zellen werden mit ^3H -Uridin inkubiert. Durch eine Bestrahlung der Zellen mit UV-Licht kann die radioaktiv markierte RNA mit den assoziierten Proteinen verknüpft werden. So können auf einem SDS-PAA-Gel 6 Hauptproteine nachgewiesen werden, die mit hnRNA in vivo assoziiert vorliegen (Economidis et al., 1983). Weitere höhermolekulare Proteine lassen sich in geringen Mengen ebenfalls nachweisen. Nach Verdauung der endogenen RNA in den hnRNP-Komplexen sind Partikel mit exogener Nukleinsäure rekonstituiert worden. Hierbei ergibt der Vergleich der Proteinzusammensetzung zwischen den ursprünglichen und den rekonstituierten Partikeln, daß nur diese 6 hnRNP-Proteine des 40S-Komplexes in beiden Partikeln zu finden sind (Wilk et al., 1983, Pullman et al., 1983).

Die sechs beschriebenen Proteine, auch als "core"-Proteine bezeichnet, wurden ursprünglich mittels ihres Dissoziationsverhaltens in drei Gruppen unterteilt. Mit zunehmender Ionenkonzentration dissoziieren die A-Proteine, gefolgt von der B-Gruppe und zuletzt die C-Proteine vom Partikel. Dies deutet schon darauf hin, daß die C-Proteine eng an die hnRNA gebunden sind (Beyer et al., 1977). Die Molekulargewichte dieser Proteine liegen zwischen 32.000 und 42.000 D. Die Proteinbezeichnung nach steigendem Molekulargewicht lautet A1, A2, B1, B2, C1 und C2.

Dieses Sextett läßt sich zweidimensional (1. Dim. NEPHGE

2. Dim. SDS-PAA-Gel, siehe 2.3) für die einzelnen Gruppen in verschiedene Proteine und ihre Ladungsisomeren trennen (Beyer et al., 1977, Suria et al., 1979, Peters et al., 1980, Wilk et al., 1985, Celis et al., 1986).

Die Proteine A1 und A2 haben teilweise drei und mehr Ladungsisomere. Die Proteingruppe B läßt sich in vier Proteine und Ladungsisomere trennen (Bezeichnung B1a, B1b, B1c und B2). Die Gruppe C besteht aus vier Proteinkomponenten, C1, C2, C3 und C3X. Die Bezeichnung der Proteine erfolgte nach ihrem Molekulargewicht und ihrem isoelektrischen Punkt, jeweils vom basischen in den sauren Bereich laufend. Ich benutze in dieser Arbeit die Nomenklatur von Wilk et al. (1985, in Gegenüberstellung Beyer et al., 1977, Celis et al., 1986 und Dreyfuss, 1988).

In ruhenden Zellen, z.B. Lymphozyten, sind die hnRNP-Proteine stärker modifiziert als in stimulierten, andererseits fehlen einzelne Proteine in ruhenden Lymphozyten (Gabaldon de Koch, 1983). Dies kann auch für andere Zelltypen gezeigt werden (LeSturgeon et al., 1978, Celis et al., 1986).

Da die hochmodifizierten Lymphozyten-hnRNP-Proteine in einem Rekonstitutionssystem geringe Tendenz zur Partikelbildung zeigen (Wilk, 1984), kann angenommen werden, daß die Modifizierung wie auch die An- und Abwesenheit einzelner hnRNP-Proteine für die Partikelausbildung und somit wahrscheinlich auch für die Effizienz des Reifungsprozesses der hnRNA eine Rolle spielen.

Die Proteine A1, A2 und C3 repräsentieren Vertreter einzelner Klassen in den Partikeln. Das Protein A1 zeigt eine Abhängigkeit von der Proliferationsrate der HeLa-Zellen: es ist in proliferierenden Zellen die Hauptkomponente der hnRNP-Partikel, in ruhenden Zellen fehlt es (LeSturgeon, 1978, Gabaldon de Koch, 1983). Das Protein A2 ist in allen Partikeln gleichmäßig vertreten. Im Gegensatz zu den basischen Proteinen (Antikörper gegen diese Gruppe inhibieren ebenfalls den Spleißvorgang, siehe oben) gehören die sauren C-Proteine zu den hnRNP-Proteinen, für die bekannt ist, daß ihre Abwesenheit den Spleißvorgang bereits früh hemmt. Der 5'-Schnitt findet in der prä-mRNA bereits nicht mehr statt, wenn diese Proteine fehlen (Choi et al., 1986).

Um Informationen über die Aminosäuresequenz der beteiligten Proteine zu erhalten, gibt es zwei Möglichkeiten, erstens Totalsequenzierung der Proteine und zweitens Teilsequenzierung und anhand dieser Information über abgeleitete Oligonukleotide die Isolierung von cDNA und deren Sequenzierung. Die isolierte cDNA kann zur Suche genomischer Klone benutzt werden, um so Aussagen über die Genkontrolle der beteiligten Proteine und die Exon-Intron-Struktur erhalten zu können.

Da die hnRNP-Proteine für einen effizienten Spleißvorgang essentiell sind, ist es interessant, wie die Struktur der codierenden Gene aussieht und ob Introns vorkommen. Hierbei ist die Frage, wie die Zellen sich die ersten prozessierten mRNAs herstellen, ohne die eigenen Genprodukte benutzen zu können. Eine Möglichkeit kann ein anderer Reifungsprozeß für diese hnRNA sein. Nach Isolierung der Gene kann getestet werden, ob die Transkription einzelner Gene mit der Ausprägung auf Proteinebene korreliert ist und sich im Zellzyklus ändert, oder ob die Transkription konstitutiv ist. In diesem Zusammenhang lassen die gewählten Proteine wiederum für ihre Genregulation bestimmte Eigenschaften erhoffen, wie etwa proliferationskontrollierte bzw. konstitutive Expression.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Teilsequenzen für die Proteine A1, A2 und C3 erhalten, um anhand dieser Daten Oligonukleotide für eine cDNA-Suche abzuleiten.

Für HeLa-Zellen wurde eine cDNA-Bibliothek im Phagen λ gt10 erstellt.

Aus dieser cDNA-Bibliothek wurden Klone für das hnRNP-Protein C3 isoliert. Nach Teilsequenzierung des längsten cDNA-Klons wurden genomische Klone identifiziert.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

Alle Chemikalien wurden in höchster Qualität (p.A.) über den Laborfachhandel von den Firmen Fluka, Merck, Serva, Roth, Riedel deHaën bezogen.

Radioaktive Substanzen:

[α - 32 P]dATP	600	Ci/mmol
[α - 33 S]dATP	500	Ci/mmol
[γ - 32 P]ATP	6000	Ci/mmol
D-threo-[dichloro-1- 14 C]Chloramphenicol	53	mCi/mmol

1 mCi entspricht $3,7 \times 10^{10}$ Bq.

Die Substanzen wurden von NEN DuPont und Amersham bezogen.

Enzyme:

Protease aus <i>Staphylococcus aureus</i> V8	EC. 3. 4. 21. 1	Miles Lab
MMLV-Reverse Transkriptase		Gibco-BRL
NAD ⁺ -Ligase aus <i>E. coli</i>	EC. 6. 5. 1. 2	Pharmacia
RNaseH	EC. 3. 1. 26. 4	Gibco-BRL
DNA-Polymerase I aus <i>E. coli</i>	EC. 2. 7. 7. 7	Boehringer
EcoRI-Methylase		Biolabs
T4-DNA-Kinase	EC. 2. 7. 1. 78	Pharmacia
T4-DNA-Ligase	EC. 6. 5. 1. 1	Pharmacia
Restriktionsenzyme		Boehringer, Pharmacia
Alkalische Phosphatase	EC. 3. 1. 3. 1	Boehringer

2.2 HeLa-Zellkultur

Medium: MEMsp (Joklik's Modifikation)

11,3 g	Trockenpulver (Gibco)
2 g	NaHCO ₃
0,45 g	Glucose
0,476 g	Hepes pH 7,4
ad 1 l mit H ₂ O	

Das Medium wurde mit jeweils 10 ml der nachfolgenden Antibiotika-Stammlösungen versetzt:

6000 u/ml	Penicillin (ca. 4 g/l)
6000 u/ml	Streptomycinsulfat (ca. 8 g/l)

HeLa S3-Zellen wurden in MEMsp-Medium mit 5 % Serum neugeborener Kälber (Gibco) bei einer Zelldichte von 5×10^5 Zellen/ml in Rührkultur gehalten. Täglich wurden die logarithmisch wachsenden Zellen 1:1 mit frischem Medium verdünnt.

2.3 hnRNP-Proteinisolierung, Sequenzierung Oligonukleotide

2.3.1 Isolierung der hnRNP-Partikel und RNA-Verdauung

Lösungen:

StM A	10 mM	Tris/HCl pH 7,0
	100 mM	NaCl
	1,5 mM	MgCl ₂

Isolation und Dichtegradientenzentrifugation wurden nach der bei Wilk et al. (1983, 1985) beschriebenen Methode ausgeführt. Für die 2d-Gelelektrophorese (siehe 2.3.1) wurden die hnRNP-Partikel des 40S-Bereiches im Sucrosegradienten mit 2,5 Vol. Ethanol gefällt (-20°C, 2 h), pelletiert (4°C, 16000 xg, 10 min), mit 70 % Ethanol salzfrei gewaschen und erneut unter den analogen Bedingungen pelletiert. Die hnRNP-Partikel wurden in StM A-Puffer, 4 M Harnstoff mit RNaseA 20 µg/ml für 2 h bei 37°C inkubiert. Die Proteine wurden mit 2,5 Vol. Ethanol bei -20°C für 2 h gefällt und wie oben beschrieben pelletiert.

2.3.2 Trennung der Proteine nach isoelektrischem Punkt und Molekulargewicht

Die isoelektrische Fokussierung der hnRNP-Proteine wurde nach dem Nichtgleichgewichtselektrophoresesystem (NEPHGE, 1800 Vh; O'Farrell et al., 1977) mit Ampholinen pH 3-10 (LKB) ausgeführt, da es sich bei den hnRNP-Proteinen zum großen Teil um sehr basische Proteine handelt.

Die Molekulargewichtsauftrennung der Proteine erfolgte nach der diskontinuierlichen Methode von Laemmli (1970) auf Polyacrylamidgelen (SDS-PAA-Gel) mit 0,1 % SDS (w/v). Die Proteine wurden mit Coomassie Blue-R angefärbt.

2.3.3 V8 Proteaseverdauung einzelner Proteine nach Cleveland et al. (1977)

Puffer:	V8 10(+)	125 mM Tris/HCl pH 6.8 1 mM EDTA 0,1 % SDS (w/v) 10 % Glycerin (v/v) 5 % β -Mercaptoethanol (v/v)
	V8 10(-)	analog V8 10(+), jedoch ohne β -Mercaptoethanol
	V8 20	analog V8 10 (-), jedoch 20% Glycerin (v/v)

Die Gelstücke aus 2d-Gelen wurden in V8 10(+)-Puffer zweimal für 0,5 h, sodann 10 min in V8 10(-)-Puffer äquilibriert und in die Taschen eines 18%igen SDS-PAA-Gel (siehe 2.3.2) geschoben. Die Geltaschen wurden mit V8 20 Puffer gefüllt und die Elektrophoresekammer zusammengebaut. In die einzelnen Geltaschen wurde V8-Protease in V8 20 Puffer nachgelegt. Die Elektrophoresebedingungen entsprachen den angegebenen (Cleveland et al., 1977), jedoch erfolgte die Elektrophorese nach der partiellen Verdauung bei hoher Stromstärke (bis zu 40 mA).

2.3.4 Elektroelution von Proteinen

Die Isolierung einzelner Proteine aus SDS-PAA- sowie 2d-Gelen erfolgte nach der bei Hunkapiller et al. (1983) angegebenen Methode.

2.3.5 Sequenzanalyse der hnRNP-Proteine

Die Sequenzanalysen wurden in Zusammenarbeit mit G. Mult-
haupt und Prof. Dr. K. Beyreuther, Institut für Genetik, Uni-
versität zu Köln, durchgeführt.

Die elektroeluierten Peptide wurden mit 0,1 Vol 10 M Ammo-
niumacetatlösung und 2,5 Vol Ethanol gefällt (mind. 4 h bei
-20°C) und pelletiert (10000 xg, 20 min, 4°C). Die Pellets
wurden im Ölpumpenvakuum getrocknet. Die Sequenzanalyse
wurde auf einem Applied-Biosystems-Proteinsequenator 470A
nach Hewick et al. (1981) und Beyreuther et al. (1983) mit
1,5 mg Polybren/Edmanabbau durchgeführt. Die Analyse der
Phenylthiohydantoin-Aminosäure erfolgte auf einer Zorbax
Cyanopropylsilan-Säule (DuPont).

Die Elution wurde mit 67 % Natriumacetatlösung (8-25 mM, pH
4,2) und 33 % Puffer B (71,4 % THF, 20 % Acetonitril, 8,6 %
Methanol) auf einer 25x ϕ 0,46 cm Säule ausgeführt.

2.3.6 Oligonukleotidsynthese

Die aus der Aminosäuresequenz abgeleiteten Oligonukleotide
wurden chemisch nach der Phosphoramiditmethode (Matteucci et
al., 1981, Sinha et al., 1984) auf DNA-Synthesemaschinen in
den Laboratorien von Prof. Dr. K. Beyreuther (Universität
Köln), Prof. Dr. U. Kück (Universität Bochum) und Prof. Dr.
K. P. Schäfer (Byk Gulden, Konstanz) hergestellt. Die Auf-
reinigung der Oligonukleotide über Gelelektrophorese, jedoch
ohne ein Sammelgel, und DEAE-Cellulosechromatographie ent-
sprach der bei Strauss et al. (1985) beschriebenen Methode.

2.4 Isolierung von RNA und DNA

2.4.1 poly(A⁺)-RNA-Isolierung

Lösungen:	PBS-Puffer	10 mM Na ₂ HPO ₄ 2 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,4 150 mM NaCl
	Lysis-Puffer	10 mM Tris/HCl pH 7,0 10 mM NaCl 1,5 mM MgCl ₂

+

HeLa-Zellen wurden bei 350 xg 15 min pelletiert und in eiskaltem PBS einmal gewaschen und nach Zentrifugation (300 xg, 10 min) in kaltem Lysis-Puffer (Zelldichte $2-3 \times 10^7$ /ml) aufgenommen, der nachträglich auf 0,5% (v/v) NP40 und 10 mM Vanadyl-Ribonuklease Inhibitor (Maniatis et al., 1982) eingestellt wurde. Die Zellen wurden in dieser hypotonen Lösung 10 min inkubiert und anschließend in einem Dounce-Homogenisator mit engsitzendem Pistill durch 5-8 Stöße aufgebrochen. Nach Pelletierung der Zellkerne (600 xg, 10 min, 4°C) erfolgte im cytoplasmatischen Überstand eine Proteinaseverdauung mit Proteinase K (200 µg/ml) in Anwesenheit von 2% SDS (w/v), 25 mM EDTA und 0,3 M NaCl für 30 min bei 37°C. Zur weiteren Aufreinigung wurde eine zweimalige Phenol- und Chloroformextraktion sowie eine Ethanolfällung (2,5 Vol. Ethanol, -20°C, 2 h) ausgeführt. Nach Pelletierung der RNA (6000 xg, 20 min, 4°C) wurde die poly(A⁺)-RNA über oligo-(dT)-Cellulosechromatographie isoliert (Maniatis et al., 1982).

2.4.2 Isolierung chromosomaler DNA

Die HeLa-Zellen wurden analog der RNA-Aufarbeitung (2.4.1) pelletiert und mit PBS gewaschen. Die Isolierung der hochmolekularen DNA entsprach der bei Maniatis et al. (1982) beschriebenen Vorschrift.

2.4.3 Isolierung von Plasmid- und λ -DNA

Bakterienstämme	Referenz
NM 538	Kaiser et al. (1985)
Q 358	Maniatis et al. (1982)
Y 1073	Young et al. (1983, a)
Y 1090	Young et al. (1983, b)
JM 109	Yanish-Perron (1985)
C 600	Appleyard, P.K. (1954)

Die Zusammensetzung der Medien und die Aufarbeitung der entsprechenden Kulturen und Lysate erfolgte in Anlehnung an die von A. Baumann (1986) und Maniatis et al. (1982) angegebenen Methoden.

Die Anzucht von λ gt10-cDNA Phagen wurde in LB-Medien und die von EMBL3-Phagen in NZ-Medien durchgeführt. Als Wirte der Phagen wurden die Stämme Y 1073 (λ gt10), Y 1090 (λ gt11) und NM 538 bzw. Q 358 (EMBL3) benutzt.

Zur Isolierung doppelsträngiger M13-DNA wurde der Bakterienstamm JM 109 als Wirt benutzt, für Bluescript-DNA (Stratagene) C 600.

2.4.4 Isolierung einzelsträngiger M13-DNA

Bakterienstämme	Referenz
JM 103, JM 101	Messing (1983)

Zur Isolierung einzelsträngiger M13-DNA wurde der Bakterienstamm JM 103 benutzt, als Stamm zur Isolierung einzelsträngiger Bluescript-DNA (Stratagene) JM 101. Die Bedingungen für die Animpfung mit dem Helferphagen entsprachen den Angaben des Herstellers. Die Bedingungen zur Isolierung einzelsträngiger DNA sind bei Davis et al. (1986) beschrieben.

2.4.5 Restriktion von DNA

Die Restriktion der isolierten DNA erfolgte nach den Herstellerangaben für die einzelnen Restriktionsenzyme. Die

2.5 In vitro Verpackung von λ -DNA

2.5.1 Anzucht der Bakterienstämme zur Präparation der in vitro Verpackungslysate

Lösungen:	CY-Medium	10 g Casamino-säuren 5 g Hefeextrakt 3 g NaCl 2 g KCl ad 1 l H ₂ O, autoklavieren +25 ml 1 M Tris/HCl pH 7,4 5 ml 1 M MgSO ₄
	Sucrose	50 mM Tris/HCl pH 7,5 10 % Sucrose (w/v)
	Puffer A	20 mM Tris/HCl pH 8.0 3 mM MgCl ₂ 1 mM EDTA 0.05 % β -Mercaptoethanol (v/v)
	Lysozym	250 mM Tris/HCl pH 7,5 2 mg/ml Lysozym
	M1-Puffer	109 μ l H ₂ O 6 μ l 0,5 M Tris/HCl pH 7,5 9 μ l 1 M MgCl ₂ 300 μ l 50 mM Spermidin / 0,1 M Putrescins-lösung pH 7,5 75 μ l 0,1 M ATP 1 μ l β -Mercaptoethanol
Stämme:	SE BHB 2690	N205recA ⁻ (λ imm434 cIts b2 red3 Eam4 Sam7) / λ
	FTL BHB 2688	N205recA ⁻ (λ imm434 cIts b2 red3 Dam15 Sam7) / λ

Die Bakterienstämme wurden erstmalig bei Hohn (1979)

beschrieben. Die Herstellung der Verpackungsextrakte erfolgte in Anlehnung an die bei Enquist et al. (1979) beschriebene Methode.

Neben dem Ultraschall behandelten Lysat ("Sonic extract") wurde auch das "Freeze-Thaw"-Lysat beschallt, um auch in diesem Lysat eine vollständige Denaturierung der DNA zu erzielen. Diese Behandlung verhindert die Verpackung endogener Phagen-DNA aus den Lysaten.

Die Bakterienstämme BHB 2688 und BHB 2690 wurden auf LB-Agar ausgestrichen, und ihr lysogenes Wachstum bei 30°C, sowie ihr lytisches bei 42°C überprüft. Kolonien der einzelnen Stämme wurden vereinzelt und zuletzt auf einer LB-Agarplatte über Nacht bei 30°C angezogen. Die gewachsenen Kolonien dienten nach Aufnahme in 5 ml LB-Medium zum Animpfen von 500 ml CY-Medium. Das Wachstum erfolgte bis zu einer A_{578} von 0,4. Die Phagen wurden durch schnelles Erwärmen des Kulturmediums auf 45°C mit Hilfe eines 60°C warmen Wasserbades unter gelegentlichem Schütteln induziert. Die Kultur wurde für 15 min bei 45°C gehalten und weiterhin für 3 h bei 37°C geschüttelt. Die Einengung der Bakterien erfolgte bei 6000 xg, 4°C für 20 min. Die Bakterien aus zwei 500 ml Kulturen wurden in 10 ml LB-Medium aufgenommen und zur weiteren Einengung in Corexgläsern bei 10000 xg, 4°C für 5 min pelletiert.

2.5.1.1 "Sonic Extract"-(SE)-Lysat

Das Bakterienpellet des BHB 2690-Stamms aus 1 l Kultur wurde in 7 ml Puffer A aufgenommen und sofort beschallt (Bedingungen: "Branson Sonifier Cell Disrupter B15", bestückt mit einer Mikrospritze; output: 4, timer: hold, %duty cycle: 50, pulsed). Die Beschallung erfolgte jeweils für 3 s mit einer 27 s dauernden Abkühlphase auf Eis, während die Mikrospritze ca. 1 cm in die Bakteriensuspension ragte. Es wurde solange beschallt, bis die zunächst hochviskose Lösung dünnflüssig wurde. Die Pelletierung der Zelltrümmer erfolgte bei 4°C im HB4-Rotor bei 16000 xg für 10 min. Der Überstand wurde aliquotiert (20-50 µl), in flüssigem Stickstoff

schockgefroren und bei -70°C gelagert.

2.5.1.2 "Freeze Thaw"-(FTL)-Lysat

Die pelletierten BHB 2688-Bakterien aus einer 1 l Kultur wurden in 4 ml Sucroslösung mit einer Pasteurpipette resuspendiert. Nach Zugabe von 50 μl Lysozymlösung erfolgte ein Schockgefrieren der Suspension in flüssigem Stickstoff und ein langsames Auftauen auf Eis. Sobald die Lösung flüssig war, wurden 50 μl M1-Puffer hinzugefügt. Um auch in diesem Lysat endogene, verpackbare Nukleinsäure zu entfernen, erfolgte ebenfalls eine Beschallung des Lysats. Die Bedingungen glichen denen des SE-Lysats (2.5.1.1), nur daß für das FTL-Lysat die Beschallung und Abkühlung 15mal durchgeführt wurde. Nach Pelletierung der Zelltrümmer (Ti75-Rotor, 42000 xg, 4°C , 60 min) wurden Aliquots (20-50 μl) des Überstandes in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

2.5.2 Testen der SE- und FTL-Lysate

Zur Überprüfung der neu hergestellten Verpackungslysate wurden beide Lysate gegen ältere sowie gegeneinander in einem 25 μl Verpackungsansatz getestet. 7 μl Puffer A, bis zu 0,5 μg λ -DNA und 1 μl M1-Puffer wurden mit unterschiedlichen Volumina der SE- und FTL-Lysate gemischt. Folgende Inkubationsschritte schlossen sich an: 10 min auf Eis, 1 h bei RT, 2 h bei 4°C . 200 μl Bakteriensuspension wurden mit entsprechenden Verdünnungen des Verpackungsansatzes inkubiert (15 min, 37°C), LB-Agarplatten mit der Baktereinsuspension geimpft (2.8), und die erhaltenen Platten für 8-10 h bei 37°C bebrütet. Die Plaqueanzahl gab ein Maß für die Verpackungseffizienz.

2.6 cDNA-Synthese

2.6.1 Synthese des 1. Stranges

Puffer: RT 5x 250 mM Tris/HCl pH 7,5
 300 mM KCl
 50 mM DTT
 15 mM MgCl₂

dNTP je 10 mM

oligo(dT)₁₂₋₁₈ 1 µg/µl

BSA 5 µg/µl

10 µg poly(A⁺)-RNA wurden mit 40 µl 5xRT-Puffer, 1 µl oligo(dT)-Lösung und 133 µl H₂O für 2 min auf 80°C erhitzt und sodann auf Eis sofort abgekühlt. Nach 30minütiger Vorhybridisierung bei Raumtemperatur wurden folgende Endkonzentrationen an BSA (0,1 µg/µl), dNTP (0,5 mM) sowie [α -³²P]dATP (40 µCi) eingestellt und mit 1000 u MMLV-Reverser Transkriptase (200u/µl) bei 37°C 30 min inkubiert. Nach Zufügen weiterer 1000 u Reverser Transkriptase wurde nochmals 30 min bei 37°C inkubiert.

Um die Syntheserate zu bestimmen, wurde ein Aliquot nach dem Stoppen der Reaktion mit EDTA (Endkonzentration: 40 mM) für eine TCA-Fällung abgenommen (siehe 2.20).

Die Extraktion der Proteine erfolgte einmal mit Phenol sowie zweimal mit Chloroform. Die Nukleinsäuren wurden aus 2 M Ammoniumacetat-Lösung mit 2,5 Vol. Ethanol bei -70°C für 30 min gefällt und bei 4°C 25000 xg für 30 min pelletiert. Das Pellet wurde mit 70% Ethanol salzfrei gewaschen und nach erneuter Zentrifugation unter analogen Bedingungen im Wasserstrahlvakuum für 2 min getrocknet.

Das Pellet der Erststrangsynthese wurde in 11 µl H₂O aufgenommen und 1 µl der Lösung zur Längenbestimmung auf einem

3%igen denaturierenden Polyacrylamidgel (siehe 2.4.6) analysiert.

2.6.2 Synthese des 2. Stranges nach Gubler et al. (1983)

Puffer: Ligase 2x 40 mM Tris/HCl pH7,5
 10 mM $MgCl_2$
 20 mM $(NH_4)_2SO_4$
 200 mM KCl
 300 μM β -NAD⁺
 100 $\mu g/ml$ BSA

dNTP 10 mM

Die Nukleinsäuren (10 μl aus 2.6.1) wurden in einem Gesamtvolumen von 100 μl (Endkonzentration 1xLig.-Puffer, 0,4 mM je dNTP) mit 12,5 u RNase H, 22 u E.coli DNA-Polymerase I sowie 1 μl NAD⁺-abhängiger DNA-Ligase für 1 h bei 12°C sowie 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Extraktion der Proteine und Fällung sowie Pelletierung der Nukleinsäuren erfolgte unter Bedingungen wie bei 2.6.1.

2.6.3 Methylierungs- und Auffüllreaktion

Puffer: Methylase 5x 500 mM Tris/HCl pH 8
 50 mM EDTA
 2 mg/ml BSA

S-Adenosylmethionin 30 mM SAM in 5 mM H_2SO_4 :Ethanol,
 (SAM) wie 9:1 (v/v), bei -20°C gelagert, vor Gebrauch 1:40 mit H_2O verdünnt

Das Pellet der Zweitstrangsynthese wurde in 5 μl H_2O aufgenommen. In einem Endvolumen von 10 μl der Konzentrationen (1x Methylase-Puffer, 0,1 M NaCl und 75 μM SAM) erfolgte die Inkubation der Nukleinsäuren mit 20 u Methylase bei 37°C für 1 h. Nach dieser Zeit wurden 2,5 μl 0,2 mM dNTP, 2,5 μl

0,1 M MgCl_2 , 1 μl 0,1 M DTT, 8 μl H_2O und 4 u E.coli DNA-Polymerase I zugegeben. Das Auffüllen der Enden erfolgte in 10 min bei 22°C. Die Proteine wurden einmal mit Phenol und zweimal mit Chloroform extrahiert. Die Fällung der Nukleinsäuren erfolgte aus 0,8 M LiCl mit 2,5 Volumen Ethanol bei -70°C für 30 min. Sie wurden den bei 2.6.1 angegebenen Bedingungen analog pelletiert, gewaschen und getrocknet.

2.6.4 Phosphorylierung der EcoRI-Linker

Lösungen: Kin. 10x 500 mM Tris/HCl pH 7,5
 100 mM MgCl_2
 50 mM DTT

Oligonukleotid 1 A_{260}/ml
 1,2x10⁻⁴ M

Um ein Verhältnis cDNA-Enden:Linker von 1:20 bis 1:50 zu erhalten, wurde die entsprechende Menge EcoRI-DNA-Linker in einem Gesamtvolumen von 10 μl für mehrere Parallelansätze (1x Kin.-Puffer, [γ -³²P]-ATP in Gegenwart von 7 u T4-Polynukleotidkinase für 15 min bei 37°C inkubiert und anschließend 1 μl 1 mM ATP-Lösung hinzugefügt. Der Reaktionsansatz wurde 4 h bei 37°C belassen und für die nachfolgende Ligation eingesetzt. Diese Teilmarkierung diente dazu, leichter die Fraktionen zu erkennen, die nach einer Gelfiltration (2.6.6) hauptsächlich die überschüssigen Eco RI-DNA Linker enthielten.

2.6.5 Ligation der cDNA mit Eco RI-Linker und Restriktion

Puffer: Lig. 10x 200 mM Tris/HCl pH 7,6
 100 mM MgCl_2
 100 mM DTT

ATP 10 mM

Nach der Auffüllreaktion wurde das Pellet in 3 μl H_2O

gelöst, die entsprechende Menge an phosphorylierten EcoRI-DNA-Linkern (2.6.4) hinzugefügt und die Nukleinsäuren in 10 µl Volumen (Konzentration: 1x Lig.-Puffer, 0.6 mM ATP) in Anwesenheit von 1 u T4-DNA-Ligase mit den EcoRI-Linkern bei 12°C über Nacht ligiert. Das Stoppen der Reaktion erfolgte durch Erhitzen auf 65°C für 10 min. Zur Restriktion der Linker wurde der Ansatz auf 20 µl 1x Hochsalzpuffer (siehe 2.4.5) eingestellt und mit 100 u EcoRI-Nuklease bei 37°C für 1 h inkubiert. Nach Phenol- und zweimaliger Chloroformextraktion erfolgte die Fällung der Nukleinsäure (siehe 2.6.1).

Um eine vollständige Restriktion sicherzustellen, wurden die Nukleinsäuren in 10 µl 1x Hochsalzpuffer einer zweiten Restriktion mit 100 u EcoRI-Nuklease bei 37°C für 1 h unterzogen. Die Entfernung von Protein und Fällung der Nukleinsäure erfolgte analog den Bedingungen der ersten Restriktion.

2.6.6 Abtrennung überschüssiger EcoRI-Linker-DNA

Laufpuffer: 10 mM Tris/HCl pH 7,5
 100 mM NaCl
 1 mM EDTA

Überzählige, kleine EcoRI-Restriktionsfragmente wurden durch Bio Gel A 50m-Gelfiltration (Durchmesser 3 mm, Höhe 300 mm, Fluß 1 Tropfen/3 min) abgetrennt (Huynh et al., 1985). Die Gelfiltration wurde vorher mit radioaktiv markierter DNA (pBR 322 HinfI restringiert) ausgetestet, um die Flußbedingungen zur Abtrennung kurzer DNA-Fragmente zu optimieren.

Das Nukleinsäurepellet nach der zweiten EcoRI-Nuklease-Restriktion wurde in 10 µl Gelfiltrationspuffer gelöst. Die Lösung wurde nach Zugabe von 5 µl 50%iger Glycerinlösung, gefärbt mit Bromphenolblau und Xylencyanol, auf die Säule aufgetragen. 3 Tropfen ergaben eine Fraktion.

Die Radioaktivität wurde über Cerenkov-Zählung im ³H-Kanal ermittelt. Einzelne Fraktionen wurden anhand von Aliquots

auf einem denaturierenden 18%igen Polyacrylamidgel (siehe 2.4.6) auf Anwesenheit von EcoRI-Linker-DNA überprüft. Linkerfreie, cDNA-enhaltende Fraktionen wurden vereinigt, die Lösung auf 1/4 Volumen im Ölpumpenvakuum eingeengt. Die Nukleinsäurefällung erfolgte mit 2,5 Volumen Ethanol in einer Zeit von 30 min bei - 70 °C. Die Pelletierung und Waschung folgte den bei 2.6.1 angeführten Bedingungen.

2.6.7 Ligation der cDNA mit den λ -Armen

Puffer: siehe 2.6.5

Das Nukleinsäurepräzipitat nach der Gelfiltration (2.6.6) wurde in 1 μ l H₂O gelöst. In 5 μ l Endvolumen 1xLig.-Puffer, 0,6 mM ATP wurde die mit EcoRI-DNA-Enden-versehene cDNA mit 0,5 μ g λ gt10 EcoRI-geschnittener, dephosphorylierter-DNA (Promega) in Anwesenheit von 3 u T4-DNA-Ligase bei 12°C für 40 h ligiert. Der Gesamtansatz dieser Ligation wurde für die in vitro Verpackungsreaktion eingesetzt.

2.6.8 In vitro Verpackung

Bakterienstämme	Referenz
Y 1073, C 600	siehe 2.4.3

Der Ligationsansatz (2.6.7) wurde unter den optimalen Bedingungen für die SE- und FTL-Lysate in zwei 25 μ l Ansätzen (je ca. 250 ng, 2.5.2) für die in vitro Verpackung eingesetzt. Nach erfolgter Inkubation für 2 h bei 4°C wurde der Verpackungsansatz mit 200 μ l SM-Puffer (2.9) verdünnt.

Zur Überprüfung wurden Aliquots der verpackte Phagen enthaltenen Lösung mit den entsprechenden Bakterienstämmen C 600 und Y 1073 für 15 min bei 37°C inkubiert und auf LB-Agar ausplattiert (2.8).

2.6.9 Amplifikation der erhaltenen cDNA-Bibliothek

Stamm	Referenz
Y 1073	siehe 2.4.3

dargestellten Methode. Für die cDNA-Suche wurden ca. 300.000 Phagen, für die genomische 360.000 ausplattiert. Die Plaque-dichte lag bei 30.000/ ϕ 150 mm Platte.

Der Transfer auf Nylonmembranen wurde wie bei Benton et al. (1977) angegeben ausgeführt. Die Lösungen zur Denaturierung und Neutralisierung entsprachen den Herstellerangaben der benutzten Hybond-N-Membranen (Amersham). Die Fixierung der DNA erfolgte bei 80°C für 2 h.

2.9 Isolierung positiver Klone

Nach Hybridisierung (2.12) und Autoradiographie (2.17) wurden die Signale des Röntgenfilmes den entsprechenden Regionen der Phagenplatten zugeordnet. Die Phagenplaques wurden mit Hilfe einer Pasteurpipette ausgestochen und mit SM-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 7,4, 100 mM NaCl, 10 mM CaCl₂, 10 mM MgCl₂, 0,05 % Gelatine (w/v)) eluiert. Es wurde ein weiteres Mal so ausplattiert, daß 400 Phagenplaques sich auf einer LB-Agarplatte (ϕ 90 mm) befanden. Die Herstellung von Filterabzügen und die nachfolgende Hybridisierung erfolgten wie unter 2.8, 2.12 und 2.17 beschrieben.

2.10 Markierung von DNA-Fragmenten nach Feinberg et al. (Oligomarkierung, 1983)

Lösungen:	DTM	100 μ M dCTP
		100 μ M dGTP
		100 μ M dTTP
		250 mM Tris/HCl pH 7,9
		25 mM MgCl ₂
		50 mM β -Mercaptoethanol

OL	90 A ₂₆₀ Hexanukleotide
	1 mM Tris/HCl pH 7,6
	1 mM EDTA

Hepes KOH	1M pH 6,6
-----------	-----------

Mix A 25 Teile DTM
 25 Teile OL
 7 Teile Hepes

Das zu markierende DNA-Fragment wurde nach der entsprechenden Restriktion auf einem TAE-LMP-Agarosegel (siehe 2.4.5 und 2.4.6) aufgetrennt. Nach Herausschneiden der DNA-Bande wurde diese mit 3 ml H₂O/g Gel versetzt. Die Denaturierung der DNA erfolgte für 7 min bei 100°C und anschließender Inkubation bei 37°C für 10 min. 25 bis 50 ng DNA wurden in einem 50 µl Volumen zusammen mit 25 µl Mix A sowie 50 µCi [α -³²P]dATP und 20 µg BSA in Anwesenheit von DNA-Polymerase I Klenow Fragment Enzym bei Raumtemperatur für 4 bis 16 h oder bei 37°C für 2 h inkubiert.

Nach dem Stoppen der Reaktion (65°C, 5 min) wurde zur Abtrennung der nicht inkorporierten Radioaktivität eine Sephadex G75-(Pharmacia)-Gelfiltration in TE-Puffer (siehe Maniatis et al., 1982) durchgeführt.

2.11 Endmarkierung von Oligonukleotiden und DNA-Fragmenten

Lösungen: Kin. 10x siehe 2.6.4.

Oligonukleotid 1 A₂₆₀/ml $\approx$ 6 pmol/µl

Zur Markierung von DNA-Fragmenten wurde die ursprüngliche DNA mit der gewählten Endonuklease, sowie 15 min vor Ende der Restriktion mit alkalischer Phosphatase inkubiert. Nach Phenol- und Chloroformextraktion erfolgte eine Fällung der Nukleinsäuren analog 2.6.1.

Die Phosphorylierung der entsprechenden 5'-OH-Oligonukleotide und DNA-Fragmente erfolgte mit einem 1,2-1,4fachen Überschuß an [γ -³²P]ATP gegenüber dephosphorylierten 5'-Enden in einem durch die Radioaktivität vorgegebenem Volumen von 10-30 µl. 7 u T4-Polynukleotidkinase wurden dem Ansatz zugegeben, der bei 37°C für 4 h inkubiert wurde

2.12 Hybridisierungen an immobilisierte RNA bzw. DNA und Plaque-Filterabzüge

Lösungen:	20x NET	400 mM Tris/HCl pH 7,8
		3 M NaCl
		20 mM EDTA
	200x Denhardt's	40 g BSA
		40 g Ficoll 400
		40 g Polyvinylpyrrolidon
		ad 1 l H ₂ O
	Lachssperma-DNA	10 mg/ml, autoklaviert
	SSC	siehe Maniatis et al., 1982

Um unspezifische Bindung der radioaktiv markierten Proben an die Membran zu unterdrücken, wurden die Filter 1-2 h unter den unten angegebenen Bedingungen ohne radioaktiv markierte Probe vorhybridisiert. Anschließend erfolgte der Austausch gegen die Hybridisierlösung. Zur Berechnung der Hybridisiertemperatur diente die bei Miyada et al. (1983) angegebene Beziehung, die für Oligonukleotide von 15 bis zu 20 bp gilt:

$$T_m = 4^{\circ}\text{C} \times \Sigma(\text{G+C}) + 2^{\circ}\text{C} \times \Sigma(\text{A+T})$$

Die Hybridisierung wurde 5-10°C unter dem berechneten Schmelzpunkt T_m für die dA-dT reichste Komponente durchgeführt.

--- cDNA-Bibliothek

Hybridisierungslösung: 6xNET, 5xDenhardt's, 0,1 % SDS (w/v), 0,1 mg/ml Lachssperma-DNA, markierte Oligonukleotide (15-25 pmol, siehe

2.11), $1-5 \times 10^6$ cpm/ml

Hybridisierungsbedingungen: 12 h

Temperatur: Oligonukleotidgemisch 38°C
eindeutiges Oligonukleotid 50°C

--- Genomische DNA-Bibliothek

Hybridisierungslösung: analog cDNA-Bibliothek, jedoch oligomarkierte DNA-Fragmente (25-50 ng, siehe 2.10) mit $1-2 \times 10^6$ cpm/ml

Lösung

Hybridisierungsbedingungen: 12 h

Temperatur: 65°C

--- Southern-Analyse (DNA-Fragmente von Phagen, Subklonen)

Je nach der eingesetzten DNA oder den Oligonukleotiden entsprach die Hybridisierung den oben angeführten Bedingungen.

--- Southern-Analyse (gesamtgenomische DNA)

Hybridisierungslösung: 6xNET, 5xDenhardt's, 0,1 % SDS (w/v), 0,1 mg/ml Lachssperma DNA, 50 % Formamid, oligomarkierte DNA-Fragmente (25-50 ng, siehe 2.10), $1-2 \times 10^6$ cpm/ml

Hybridisierungsbedingungen: 12 h

Temperatur: 42°C

--- Northern-Analyse

Die Hybridisierung von Oligonukleotiden wurde entsprechend den Bedingungen für die Hybridisierung an cDNA-Bibliotheken ausgeführt.

primer", Pharmacia, oder Oligonukleotide 5, 6 und 7) ausgeführt. Der Ansatz wurde 15-30 min bei 65°C gehalten und anschließend langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Nach Zugabe von 1 µl [α -³²S]dATP und 1,5 u DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment) wurde der Ansatz auf die vier für die einzelnen Nukleotide spezifischen Reaktionsgefäße verteilt, die jeweils 2 µl des entsprechenden Nukleotidmixes enthielten (Reaktion: 30 min, RT). Nach Zugabe weiterer 2 µl "Chase"-Mix wurde für 30 min bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 4 µl Probenpuffer (90 % (v/v) Formamid, 1 mM EDTA, je 0,15 % (w/v) Xylen Cyanol FF und Bromphenolblau) gestoppt.

Die Sequenzierproben wurden auf 4%igen, denaturierenden PAA-Gelen (siehe 2.4.6) mit Hilfe einer "2010 Macrophor Sequencing System"-Elektrophoresekammer (LKB) aufgetrennt. Die Gele wurden nach den Herstellerangaben der Elektrophoresekammer (LKB) behandelt.

Nukleotidmix	A	G	C	T
0,5 mM dATP	1	1	1	1
0,5 mM dGTP	250	12,5	250	250
0,5 mM dCTP	250	250	12,5	250
0,5 mM dTTP	250	250	250	12,5
10 mM ddATP	4	-	-	-
10 mM ddGTP	-	8	-	-
10 mM ddCTP	-	-	4	-
10 mM ddTTP	-	-	-	25
TE (pH 8,0)	250	500	500	500

2.15 Sequenzierung mit modifizierter T7-Polymerase Sequenase™

Die Sequenzierung mit T7-Sequenase folgte nach Angaben des Hersteller (United States Biochemical). Die Trennung der sequenzierten Proben erfolgte wie unter 2.14 beschrieben.

2.16 "Primer-extension"-Reaktion

Die Kartierung des 5'-Endes der mRNA erfolgte in einem Volumen von 50 µl, wobei die Endkonzentrationen dem Ansatz 2.6.1 entsprachen. Es wurden jedoch 5 µg poly(A⁺)-RNA für die Reaktion mit 0,5 pmol 5'-³²P-markiertem Oligonukleotid (1 und 2, ca. 90000 cpm) eingesetzt. Die Vorhybridisierung des Oligonukleotids an die mRNA wurde bei Raumtemperatur für mindestens 1 h durchgeführt. Die Reverse Transkriptase inkubierte mit dem vollständigen Ansatz für 5 min bei Raumtemperatur und für eine weitere Stunde bei 37°C. Die Proben wurden einmal mit Phenol sowie Chloroform extrahiert und entsprechend den Angaben unter 2.6.1 mit Ethanol gefällt. Das Präzipitat wurde in 4 µl Formamid-Probenpuffer (siehe 2.4.6) aufgenommen und auf einem 3%igen Harnstoff-Polyacrylamidgel analysiert.

2.17 Bestimmung der Chloramphenicolacetyltransferase-(CAT)-Aktivität

Plasmide	Referenz
pSV2-CAT	Gorman et al. (1982)
pCAT3N	Gorman (1985)

Das 420 bp lange SmaI-DNA-Fragment aus dem ursprünglichen, genomischen BamHI-DNA-Fragment wurde in das mit der Nuklease BglII linearisierte und mit dNTPs und DNA-Polymerase I Klenow-Fragment aufgefüllte pCAT3N-Plasmid (freundlicherweise von Prof. Dr. B. J. Benecke zu Verfügung gestellt) ligiert (Bed.: 10 µl Ansatz analog 2.6.7 mit 100 ng Plasmid-DNA) und der Bakterienstamm C 600 (siehe 2.4.3) mit dem Konstrukt transformiert (2.13). Nach Isolation der DNA (siehe 2.4.3) und Bestimmung der Klonierungsorientierung wurde superhelicale Plasmid-DNA nach zweimaliger CsCl-Dichtegradientenzentrifugation isoliert (siehe 2.4.2).

Hela-Zellen wurden mit der reinen Plasmid-DNA nach der CaPO₄-DNA-Copräzipitationsmethode (Graham et al., 1973, Spandidos et al., 1984, Gorman, 1984) transfiziert. Die Zellen wurden nach 48 h anhand der bei Lopata et al. (1984)

beschriebenen Methode durch dreimaliges Einfrieren und Auftauen in 250 mM Tris/HCl (pH 7,8) aufgebrochen (Ethanol/-Trockeneis). Zelltrümmer wurden sedimentiert, und der Überstand für die Bestimmung der CAT-Aktivität eingesetzt.

Die Inkubation mit 0,2 μCi ^{14}C -Chloramphenicol erfolgte nach der bei Gorman et al. (1982) dargestellten Methode für 1 h bei 37°C. An die nachfolgende Extraktion mit Essigsäureethylester und Trocknung der organischen Phase im Vakuum schloß sich eine Dünnschichtchromatographie (Polygram GS UV₂₅₄, Macherey-Nagel, Laufmittel: CHCl_3 /Methanol, 95/5) sowie eine Autoradiographie (2.18) an.

2.18 Autoradiographie

Die Autoradiographie erfolgte für ^{32}P - und ^{14}C -markierte Proben mit vorsensibilisierten Röntgenfilmen (Laskey et al., 1975) und Verstärkerfolie (Cronex Du Pont) bei -70°C, die Exposition für ^{35}S -markierte Proben bei Raumtemperatur auf Agfa Röntgenfilmen.

2.19 Auswertung der DNA-Sequenzdaten

Die Nukleotidsequenzen wurden mit dem Microgenie Sequenzanalyseprogramm (Queen et al., 1984) ausgewertet.

2.20 TCA-Fällung von Nukleinsäuren und Bestimmung der Radioaktivität

Die radioaktiv markierte DNA wurde mit 20 μg tRNA aus einem Volumen von 160 μl mit 40 μl 50%iger, eiskalter Trichloressigsäure (TCA) für 15 min auf Eis gefällt. Nach Zentrifugation (10000 xg, RT) wurde das Pellet zweimal mit kalter 5%iger TCA gewaschen.

Die Bestimmung der Radioaktivität erfolgte nach Cerenkov im ^3H -Kanal. Die Zählausbeute für ^{32}P -markierte Proben lag bei 50 %.

3 Ergebnisse

3.1 Isolierung und Sequenzierung von hnRNP-Proteinen

HeLa-S3 Zellen wurden durch hypotone Lyse aufgebrochen. Die intakten Zellkerne setzten bei pH 8,0 durch Aktivierung einer endogenen Nuklease monomere Ribonukleoprotein-Komplexe (hnRNP-Komplexe) frei. Diese sedimentieren in einem 15-30 % Sucrosegradienten bei 40S (Beyer et al., 1977, Wilk et al. 1983, 1985). Aus ca. $1,5 \times 10^9$ Zellen konnten im 40 S Bereich des Sucrosegradienten 2-5 mg Protein isoliert werden (siehe 2.3.1).

Nach RNA-Verdauung der isolierten Partikel wurden die Proteine durch ein- oder zweidimensionale Gelelektrophorese aufgetrennt (siehe 2.3.2). Wie Abb. 1 A zeigt, trennt ein SDS-PAA-Gel die Proteine in Dubletts auf, die nach der ursprünglichen Nomenklatur mit A1, A2, B1, B2, C1 und C2 bezeichnet wurden (Beyer et al., 1977). Eine Trennung der Proteine auf 2d-Proteingelen ergibt jedoch ein uneinheitliches Bild (Wilk et al., 1985). Die aufgeführten 6 Proteinkomponenten werden in verschiedene Proteine und ihre Ladungsisomeren getrennt (Abb. 1 B und zur Erläuterung der Nomenklatur 1 C). Die Hauptkomponenten A1, A2 und C3 wurden zur Aminosäuresequenzierung eingesetzt. Dazu wurden die Proteine aus 2d-Gelen isoliert, da das hnRNP-Proteingemisch sich säulenchromatographisch schlecht trennen läßt (Karn et al., 1977, Pandolfo et al., 1987, Piñol-Roma et al., 1988). Einzelne Proteinkomponenten der Partikel lassen sich nicht so trennen, daß sie auf 2d-Gelen als Einzelproteine nachzuweisen sind.

Für eine Sequenzierung bieten Teilpeptide mehr Informationen, da gleichzeitig mehrere Peptide bei einer Spaltung erhalten werden können, und somit vielleicht mehrere Oligonukleotide für ein Protein abzuleiten sind. Außerdem waren Vorarbeiten zur Sequenzierung der hnRNP-Proteine beschrieben, die einen modifizierten Aminoterminus für die Proteine ergaben (Billings et al., 1977). Für die Proteine A1, A2 und C3 mußten deshalb Peptide isoliert werden. Die einfachste Methode war eine Spaltung der aus 2d-Gelen ausgeschnittenen

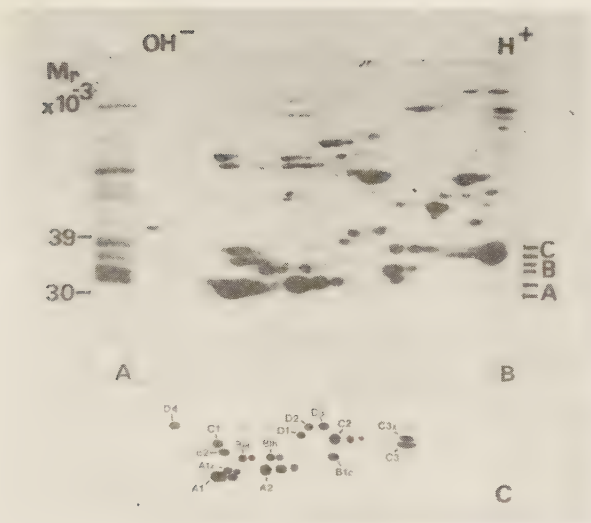


Abb. 1:
Gelektrophoretische Trennung der hnRNP-Proteine

- A) Trennung nach Molekulargewicht auf einem 10%igen SDS-PAA-Gel (auf der rechten Seite der Abb. ist die Nomenklatur für die Trennung nach M. angegeben)
- B) 2d-Auftrennung der Proteine (1. Dim. NEPHGE, 2. Dim. 10%iges PAA-SDS-Gel, siehe 2.3.1) aus dem 40S-Bereich eines 15-30%igen Sucrosegradienten
- C) Schema für die Bezeichnung der Proteine aus dem "core"-Bereich der hnRNP-Partikel

Proteine, die als Gelstück in die Taschen eines weiteren SDS-PAA-Geles gefüllt werden. Anschließend erfolgte eine Spaltung mit V8-Protease im Gel. So konnten für die Hauptkomponenten (Abb. 1) A1, A2 und C3 Peptide hergestellt werden. Wie Abb. 2 zeigt, wurden für die einzelnen Proteine (A1, A2 und C3) unterschiedliche Konzentrationen der V8-Protease eingesetzt, um die in der Abb. 2 bezeichneten Peptide in ausreichender Menge zu erhalten. Diese Teilpeptide (150 - 500 pmol) wurden nach einer Elektroelution sequenziert. Die Sequenzierung wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. K. Beyreuther (Universität Köln) ausgeführt.

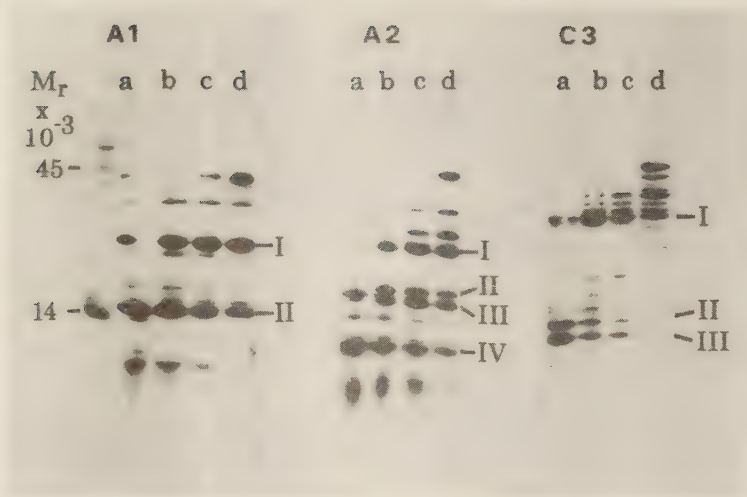


Abb. 2:

Peptidkartierung der hnRNP-Proteine A1, A2 und C3

Einzelne Proteinflecken wurden aus einem 2d-Gel ausgeschnitten und auf einem 18%igen FAA-SDS-Gel in Anwesenheit von V8-Protease erneut aufgetrennt (2.3.2). Die Menge an V8-Protease in den einzelnen Geltaschen betrug bei a) 300 ng, b) 100 ng, c) 50 ng und d) 5 ng. Die Ziffern an den erhaltenen Peptiden geben die Nomenklatur für die nachfolgende Sequenzierung an.

Die Daten der Sequenzierung sind in Tab. 1 zusammengefaßt. Die Sequenzierung des Peptides A1/II ergab für die Aminosäure 6 sowohl Serin, als auch Asparagin. Dies läßt den Schluß zu, daß das Protein A1 als ein Gemisch verschiedener Proteine mit dennoch gleicher Ladung in HeLa-Zellen vorliegt.

Die innerhalb dieser Arbeit erhaltenen Aminosäuresequenzdaten der Proteine A1 und A2 dienten Herrn K. Melchers, SteHeesen (Byk Gulden) und Frau B. Henrich (Ruhr Universität Bochum) zu ihrer Isolierung von cDNA-Klonen.

Die Sequenz für das Protein C3 wurde von mir für die Ableitung von Oligonukleotiden und die weitere Charakterisierung

von cDNA- und genomischen DNA-Klonen eingesetzt.

Tabelle 1:
Proteinsequenzen für die hnRNP-Proteine A1, A2 und C3

Peptid	Sequenzdaten
A1/I	NH ₂ -Terminus blockiert
	1 Asn 10
A1/II	Met Ala Ser Ala Ser Ser Ser Gln Arg Gly
	11 20
	Arg Gly Arg Ser Gly Ser Gly Asn Phe Gly
	21 30
	Gly Gly Arg Gly Gly Gly Phe Tyr Phe Asn
	31 32
	Gln Asn
A2/I	NH ₂ -Terminus blockiert
A2/II	NH ₂ -Terminus blockiert
	1 10
A2/III	Val Ala Glu Thr Arg Ser Gly Arg Gly Gly
	11 13
	Asn ? Gly
	1 10
A2/IV	Glu Gly Lys Thr Glu ? ? ? Asp Thr
	11 20
	Gly Ala Ser Thr Val Val Lys Trp Ser Ala
	21 28
	Gly Glu ? ? Ser Ala ? Ser
C3/I	NH ₂ -Terminus blockiert
	1 10
C3/II	Met Tyr Gly Ser Ser Phe Asp Leu Asp Tyr
	11 20
	Asp Phe Gln Arg Asp Tyr Tyr Asp Arg Met
	21 28
	Tyr Arg Tyr Pro Ala Gly Val Pro
C3/III	NH ₂ -Terminus blockiert

Die Sequenzdaten des Peptides A1/II zeigen eine Homologie zu dem Helix-destabilisierenden Protein UPI ("unwinding protein I"). Sie unterstützen daher die Experimente, in denen Antikörper gegen UPI mit den hnRNP-Proteinen reagieren (Valentini et al., 1985).

Über diese Antikörper wurde ein cDNA-Klon isoliert, dessen Leserahmen länger war als für das 24 kD große, 195 Aminosäure lange UPI-Protein zu erwarten war (Riva et al., 1986, Williams et al., 1985). Vom Aminoterminal aus folgte nach 184 Aminosäuren die Peptidsequenz des Peptides A1/II, an die

sich weitere 103 Aminosäuren anschlossen. Die gesamte Aminosäuresequenz ergab eine Homologie zu der Aminosäurezusammensetzung des Proteins A1 (Wilk et al., 1985).

3.2 Auswahlkriterien der Oligonukleotide

Im weiteren Teil der Arbeit habe ich mich mit dem hnRNP-Protein C3 und dessen weitere Charakterisierung anhand von cDNA- und genomischen Klonen beschäftigt.

Ausgehend von den erstellten Aminosäuresequenzdaten sollten Klone für das hnRNP-Protein C3 isoliert werden. Nur das Peptid C3-II ergab Sequenzdaten, da die beiden anderen Peptide einen modifizierten Aminoterminal tragen. Mittels dieser Daten wurden verschiedene Oligonukleotide für eine DNA-Synthese ausgewählt. Da der genetische Code degeneriert ist, können von der Aminosäuresequenz nur degenerierte Oligonukleotide abgeleitet werden (siehe Tabelle 2, 3). Deren DNA-Sequenz wurde jeweils als "anti sense"-Strang zur mRNA synthetisiert, um eine Hybridisierung an immobilisierte RNA ebenfalls zu erlauben.

Tabelle 2:

Aminosäuresequenz des Peptids C3/II, Degenerationsmöglichkeiten und Lage der ausgewählten Oligonukleotide mit ihrer Bezeichnung

Deg.:	1	2	4	6	6	2	2	6	2	2	2	2	2	6	2
Seq.:	1-Met	Tyr	Gly	Ser	Ser	Phe	Asp	Leu	Asp	Tyr	Asp	Phe	Gln	Arg	Asp
										1					
Deg.:	2	2	2	6	1	2	6	2	4	4	4	4	4		
Seq.:	16-Tyr	Tyr	Asp	Arg	Met	Tyr	Arg	Tyr	Pro	Ala	Gly	Val	Pro-28		
			-2/3/4		3/4										

Tabelle 3:

Synthetisierte Oligonukleotide

1: 5'-CGCTGGAAGTCGTAGTC TT A A A A	4: 5'-TACATTCTATCATAATAATC C G G G G
2: 5'-CTGTCGTAGTAGTC GA A A A	5: 5'-TACACGGGAGTTCATGGAGCGAGG
3: 5'-TACATCCGATCATAATAATC T G G G G G A	6: 5'-AATAGGAGGAGGAGGAGGTAC
	7: 5'-GTCATCCCCCGATCTTCATTATC

Die Sequenz $\text{NH}_2\text{-AspTyrAspPheGlnArg}$ ergab das Oligonukleotid 1 mit einer Länge von 17 b und einer 64fachen Degeneration. Das mögliche 18. Nukleotid der abgeleiteten Sequenz wurde vernachlässigt, um nicht eine noch höhere Degeneration zu bekommen. Gleiches galt für die Sequenz $\text{NH}_2\text{-AspTyrTyrAspArg}$ und das Oligonukleotid 2 mit einer Länge von 14 b und einer 32fachen Degeneration.

Mit diesen beiden Oligonukleotiden waren weder bei einer Hybridisierung gegen RNA noch in einer cDNA- und genomischen Bibliothekssuche eindeutige Signale zu erhalten. Jedoch ergab das Oligonukleotid 2 in "primer extension"-Versuchen mit Reverser Transkriptase Signale einer spezifischen DNA-Verlängerung (siehe 3.4). Weiterhin hat man bei solch kurzen Oligonukleotiden erhebliche Schwierigkeiten, zwischen spezifischen und unspezifischen Signalen zu unterscheiden, da es bei den notwendigerweise niedrigen Hybridisierungstemperaturen häufig zu einer unspezifischen Bindung der radioaktiv markierten Probe an die Membran kommt.

Die Oligonukleotide 1 und 2 ließen sich nur schlecht mit radioaktivem $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ endmarkieren. Eine andere Methode der Markierung bestand in der spezifischen Verlängerung der Oligonukleotide mit $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ in Anwesenheit von terminaler Transferase, die nach Herstellerangaben (BRL) ausgeführt wurde. Bei einer Hybridisierung mit verlängerten Oligonukleotiden mußte als Kompetitor Oligo(dA) zugesetzt werden, um eine Hybridisierung an poly(dT) -Bereiche in der mRNA zu unterbinden. Jedoch führte auch diese Suche nicht zum Erfolg, da die Hybridisiertemperatur für diese Oligonukleotide nicht erhöht werden konnte.

Aus diesem Grund wurden längere Oligonukleotide ausgewählt, die für die Sequenz $\text{NH}_2\text{-AspTyrTyrAspArgMetTyr}$ (siehe Tab. 2 und 3) codieren. Es wurden zwei Gemische mit einer Länge von 20 Basen und einer 64fachen (Oligonukleotid 3, $\text{Arg}=5'\text{T-C-TC}$) und 32fachen (Oligonukleotid 4, $\text{Arg}=5'\text{G-C-AGCT}$) Degeneration synthetisiert, wobei sich die Oligonukleotide nur im Codon der Aminosäure Arginin unterschieden. Diese beiden Oligonukleotide ergaben bei Hybridisierung gegen RNA und bei einer Suche in der cDNA-Bibliothek eindeutige Signale.

Zu dieser Zeit, nach Identifikation positiver, mit dem

Oligonukleotid 4 hybridisierender cDNA-Klone sowie übereinstimmender Northernanalysen (siehe 3.3 und 3.6), veröffentlichte eine amerikanische Arbeitsgruppe (Swanson et al., 1987) die Sequenz eines cDNA-Klons für das Protein C3. Durch diese Daten wurde die bestimmte Aminosäuresequenz für das Peptid C3/II bestätigt.

Nach den nun vorhandenen Sequenzdaten des cDNA-Klons wurden eindeutige Oligonukleotide ($5'=\text{NH}_2\text{ProArgSerMetAsnSerArgVal}$, $6'=\text{NH}_2\text{ValProProProProProIle}$ und $7'=\text{NH}_2\text{AspAsnGluAspArgGlyAspAsp}$) aus dem codierenden Bereich des cDNA-Klones synthetisiert, um die Suche nach genomischen Klonen zu erleichtern. Die Oligonukleotide sind so gewählt, daß sie zum Aminoterminal (Position im cDNA-Klon 153-176, siehe Abb. 10), zur Mitte (Pos. 510-530) und zum Carboxyterminus (Pos. 894-917) des Proteins C3 auf DNA-Ebene homolog sind. Somit standen weitere Oligonukleotide für die Suche nach cDNA- und genomischen Klonen zur Verfügung.

3.3 Northernanalyse

Zum Nachweis von Transkripten wurde poly(A⁺)-RNA gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf Nylonmembranen übertragen und fixiert. Die RNA wurde gegen einzelne Oligonukleotide hybridisiert. Die Oligonukleotide 1 und 2 ergaben keine Signale (siehe 3.2).

Abb. 3:

Hybridisierung von Oligonukleotiden an RNA

5 µg poly(A⁺)-RNA wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf Nylon-Membran transferiert. Die Hybridisierung erfolgte für die RNA auf einem Membranstreifen gegen 5'-endmarkierte Oligonukleotide und oligonukleotidmarkierte DNA-Fragmente (Methoden siehe 2.10, 2.11 und 2.12).

A	Oligonukleotidgemisch von 3 und 4
B	Oligonukleotid 3
C	Oligonukleotid 4
D	Oligonukleotid 7
E	Fragment eines Actin-Klones aus Huhn (Rothe, 1985)
F	Fragment eines Tubulin-Klones aus Huhn (Rothe, 1985)
G	Fragment eines menschlichen C2-Klones (Lahiri et al., 1986)

Abbildung siehe Seite 37

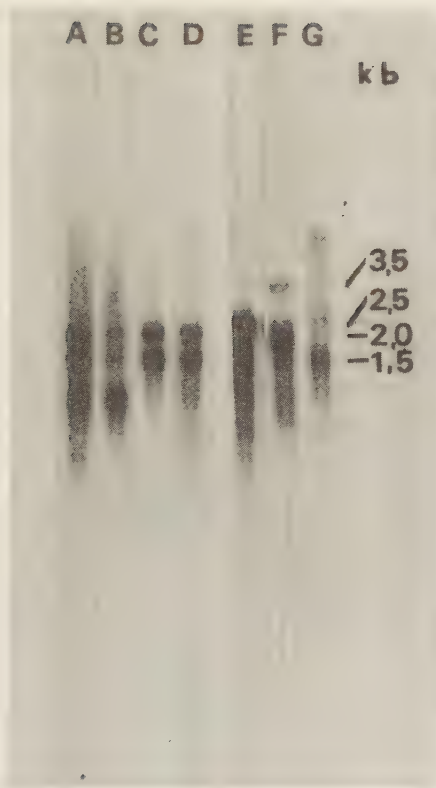


Abb. 3: Beschreibung siehe Seite 36

Wie Abb. 3 zeigt, hybridisieren die Oligonukleotide 4 und 7 an mRNAs der Längen 1,4 und 1,9 kb. Für das hnRNP-Protein C3 existieren in HeLa-Zellen 2 Transkripte mit einer Länge von 1,4 und 1,9 kb, wie ebenfalls Nagakawa et al. (1986) zeigen konnten.

Das Gemisch der Oligonukleotide 3 und 4 erkennt mRNA's der Längen: 1,0, 1,4 und 1,9 kb. Wie anhand der cDNA-Sequenz (Swanson et al., 1987) abgeleitet werden kann, sollte nur das Oligonukleotid 4 die richtigen mRNAs erkennen. Das Oligonukleotid 3 erkennt hauptsächlich eine mRNA mit der Länge von 1,0 kb. Ob diese mRNA mit den hnRNP-mRNAs in Zusammenhang zu bringen ist, bleibt fraglich.

Als interner Standard wurde die RNA auf den Membranen gegen

β -Actin-(Huhn)-, β -Tubulin-(Huhn)- sowie hnRNP-C2-(humanes Hepatom)-DNA hybridisiert.

3.4 "primer extension"-Versuch an poly(A⁺)-RNA

Ein Versuch zur Bestimmung der Lage des 5'-Endes einer mRNA kann über die Verlängerung eines spezifischen Oligonukleotides von seiner Hybridisierungsstelle mit Hilfe von Reverser Transkriptase ausgeführt werden (siehe 2.16). Ein solcher Versuch ergab nur für das Oligonukleotid 2, das zu dieser Zeit zur Verfügung stand, ein eindeutiges Ergebnis (Abb. 4). Das 5'-Ende der mRNA für das Protein C3 sollte von

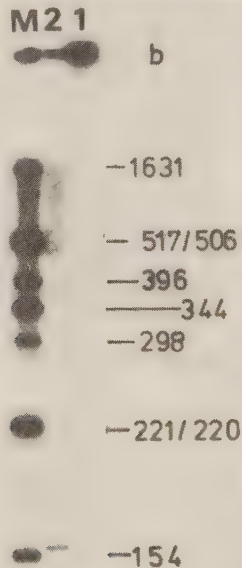


Abb. 4:
Längenbestimmung
des 5'-Endes von
Transkripten

5 μ g poly(A⁺)-RNA wurden mit den radioaktiv endmarkierten Oligonukleotiden 1 bzw. 2 zusammen in einem 50 μ l Ansatz in Anwesenheit von Reverser Transkriptase inkubiert (2.16). Die Längenbestimmung der revers transkribierten DNA erfolgte zusammen mit endmarkierten pBR 322-HinfI-Fragmenten als Längenstandard auf einem denaturierenden, 3%igen PAA-Gel.

der Hybridisierungsstelle mindestens 500 Basen und maximal 700 Basen entfernt liegen, denn die Trennkapazität eines 3%igen denaturierenden PAA-Geles reicht in diesem Bereich nicht aus um eine genauere Aussage zu erlauben. Die Banden bei ca. 150 b Länge können nur Abbruchbanden sein.

Die Proteine C3 und C3X werden von Antikörpern beide erkannt (Dreyfuss et al., 1984, Choi et al., 1984). Dies könnte die beiden Banden in der "primer extension"-Analyse so erklären, daß die Lage des 5'-Endes der mRNAs in den Transkripten für C3 und C3X 5'-aufwärts sich nur um etwa 100 b Länge voneinander unterscheiden.

Die Zelle könnte somit jeweils mRNAs mit einer Länge von etwa 1,4 und 1,9 kb für die Proteine C3 und C3X enthalten (siehe 3.3). Dies würde für beide Transkripte bedeuten, daß sie die gleiche Länge von der Hybridisierungsstelle des Oligonukleotides 2 zum 5'-Ende besitzen. Ansonsten müßten bei dieser Analyse weitere Banden zu identifizieren sein. Die Transkripte können sich deshalb nur in der Länge ihres 3'-Endes unterscheiden.

3.5 Erstellung einer cDNA-Bibliothek

3.5.1 In vitro Verpackungsextrakte

Die Erstellung einer cDNA-Bibliothek in λ -Phagen setzt voraus, daß die Möglichkeit zur Verpackung der DNA besteht (2.5). Es wurden zwei verschiedene Lysate hergestellt. Im SE-Lysat (D amber-Mutation) befinden sich nur Vorköpfe für die nachfolgende Verpackung der λ -DNA, im FTL-Lysat (E amber-Mutation) hauptsächlich Phagenschwänze. Im Verpackungsansatz reifen die Vorköpfe zusammen mit der λ -DNA zu fertigen Phagenköpfen, die dann den im FTL-Lysat vorhandenen Phagenschwanz binden. Die erhaltenen Phagen lassen sich danach wie "normale" behandeln.

Die Effizienz der Lysate lag bei $3-8 \times 10^7$ Phagen für $1 \mu\text{g}$ $\lambda\text{gt}10$ -DNA. Beim Vergleich mit Angaben aus der Literatur (10^7 bis 10^8 μg λ -Wildtyp-DNA, Maniatis et al. 1982) ist zu beachten, daß dort meist die 48,5 kb lange λ -Wildtyp-DNA

als Referenz-DNA verwendet wurde. Die λ gt10-DNA hat jedoch nur eine Länge von 43,8 kbp. Somit kann die Verpackungseffizienz nicht direkt verglichen werden. Um eine cDNA-Bibliothek in dem Phagen λ gt10 zu verpacken, ist es jedoch wichtig die Verpackungslysate auf diesen Phagen zu eichen, denn eine cDNA mit einer Länge von 5 kbp, um λ -Wildtyplänge zu erreichen, wird bei einer cDNA-Klonierung seltener vorkommen.

3.5.2 cDNA-Synthese

Aus ca. $1,5 \times 10^9$ HeLa-Zellen konnten 5 mg RNA (2.4.1) isoliert werden, daraus erhielt ich nach oligo(dT)-Chromatographie zwischen 300 und 700 μ g poly(A⁺)-RNA.

Die poly(A⁺)-RNA für die cDNA-Synthese entstammt der gleichen RNA-Präparation, von der ein Teil zur Transkriptanalyse eingesetzt wurde. Für die Erststrangsynthese der cDNA wurden die optimalen Salzbedingungen zwischen 0 und 120 mM KCl, sowie für die An- und Abwesenheit von Actinomycin D ausgetestet. Hierbei galt als Kriterium, möglichst lange Syntheseprodukte zu erhalten (siehe Abb. 5, Seite 33).

Die eingesetzte MMLV-("Moloney Murine Leukemia Virus") Reverse Transkriptase ist nach den Herstellerangaben für die Synthese langer Transkripte besser geeignet als die häufig eingesetzte AMV-("Avian Myeloblastosis Virus") Rev. Transkriptase (BRL focus 7, 1, 1985), da sie eine reduzierte RNase H-Aktivität hat und keine DNA-Endonuklease beinhaltet.

Abb. 5:

Salzabhängigkeit der MMLV-Reversen Transkriptase

2 μ g poly(A⁺)-RNA wurden in einem 50 μ l Ansatz mit unterschiedlichen Salzkonzentrationen, sowie in An- und Abwesenheit von Actinomycin D (50 μ g/ml), wie bei 2.6.1 beschrieben, mit Rev. Transkriptase inkubiert. Für die angegebenen Konzentrationen an KCl wurde kein Actinomycin D dem Inkubationsansatz zugegeben. Die Längenanalyse der cDNA wurde auf einem 4%igen denaturierenden PAA-Gel mit markierten pBR 322-HinfI-Fragmenten ausgeführt.

Gelbahn	A	120mM KCl	Gelbahn	E	60mM KCl
	B	100mM KCl		F	40mM KCl
	C	75mM KCl mit Actinomycin D		G	20mM KCl
	D	75mM KCl ohne Actinomycin D		H	0mM KCl

Abbildung siehe Seite 41

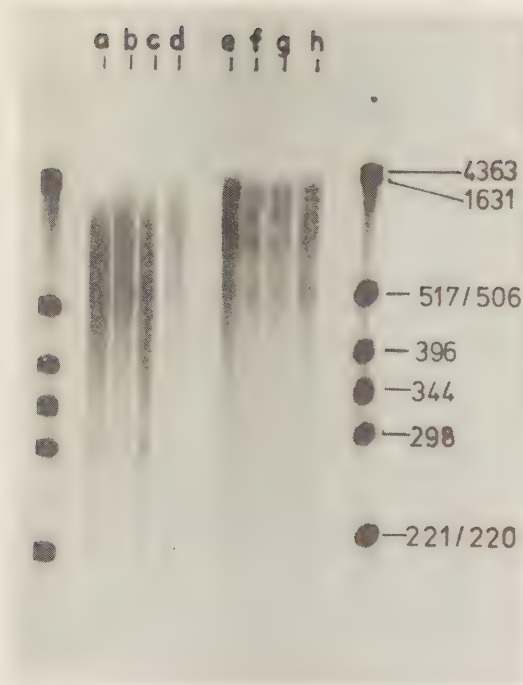


Abb. 5: Beschriftung siehe Seite 40

Die MMLV-Reverse Transkriptase hat bei 60 mM KCl, in Abwesenheit von Actinomycin D ihre optimalen Bedingungen für die Synthese des ersten Stranges. Die Einbauraten für das radioaktive [α - 32 P]dATP lagen entsprechend den Herstellerangaben bei 20-25 % für die eingesetzte mRNA-Population (BRL focus 7, 1, 1985).

Die Synthese des ersten Stranges erfolgte unter den bei 2.6.1. angegebenen Bedingungen. Ausgehend von 10 μ g poly(A⁺)-RNA wurden 2,5 μ g einzelsträngige cDNA synthetisiert (siehe Abb. 6), die für die Synthese des zweiten Stranges eingesetzt wurden. Für diese Synthese ist es

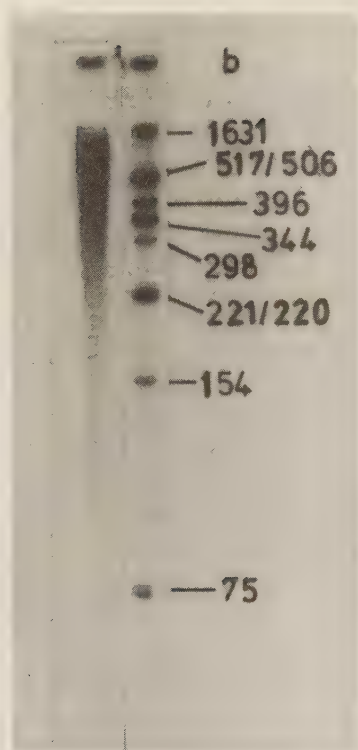


Abb. 6:
cDNA-Erststrangsynthese

10 µg poly(A*)-RNA wurden in einem 200 µl Ansatz wie bei 2.6.1 angegeben mit Rev. Transkriptase inkubiert. Ein Aliquot der Reaktion wurde auf einem denaturierenden, 3%igen PAA-Gel getrennt. Als Längenstandard diente endmarkierte pBR 322-Hinf I-Fragmente.

schwer, eine Ausbeute anzugeben, da im Reaktionsansatz DNA-Polymerase I aus *E. coli* vorliegt, die eingebaute, radioaktiv markierte Nukleotide über ihre 5'-3'-Exonukleaseaktivität entfernen kann. Auch bei der auf die Methylierung interner EcoRI Schnittstellen in der cDNA folgenden Auffüllreaktion wird DNA-Polymerase I eingesetzt. Nach allen Schritten der Zweitstrangsynthese wurde eine Abnahme der Radioaktivität von 50 % festgestellt. Die Längenverteilung der methylierten doppelsträngigen cDNA glich der der Erststrangsynthese.

Nach Ligation von EcoRI-Linkern an die doppelsträngige cDNA mußten die in polymerer Form angehefteten Linker restrigiert und von der cDNA abgetrennt werden. Die Abtrennung erfolgte mittels Gelfiltration (siehe 2.6). Die dazu verwendete BioGel A 50m Säule wurde durch eine Chromatographie radioaktiv markierter pBR322-HinfI-DNA-Fragmente sowie bei gegebenen endmarkierten EcoRI-Linkern standardisiert (siehe Abb. 7).



ADD. 7:

Standardisierung der Linkerabtrennung mit Hilfe von pBR 322 Hinf I-Fragmenten auf einer BioGel A 50m-Matrix in Anwesenheit von EcoRI-Linkern

Um eine möglichst vollständige Abtrennung der EcoRI-Linker von der zu klonierenden cDNA zu erreichen, wurden endmarkierte pBR 322 HinfI-Fragmente sowie endmarkierte Eco RI-Linker zusammen auf einer BioGel A 50m-Matrix unter verschiedenen Laufbedingungen aufgetrennt. Einzelne Fraktionen wurden anschließend auf einem denaturierenden, 18%igen PAA-Gel auf Anwesenheit von EcoRI-Linkern hin überprüft. Die Bedingungen für die Abtrennung der Linker von der cDNA sind bei 2.6.6 angegeben.

Die Abtrennung der überschüssigen EcoRI-DNA-Fragmente von der cDNA erfolgte dann unter analogen Bedingungen. Einzelne Fraktionen wurden immer gelelektrophoretisch auf Anwesenheit

von EcoRI-Linker-DNA untersucht, bevor sie weiter zur Ligation mit λ -DNA eingesetzt wurden. Die anschließende Ligation der durch EcoRI-DNA-Fragmente versehenen cDNA mit λ gt10-Armen kann nur über in vitro Verpackung und nachfolgende Infektion von Bakterienstämmen überprüft werden. Um zwischen rekombinanten λ gt10-Klonen und nicht rekombinanten unterscheiden zu können, erfolgte die Infektion jeweils mit gleicher Verdünnung des in vitro Verpackungsansatzes in den Bakterienstämmen C 600 und Y 1073. Letzterer Bakterienstamm enthält in seinem Genom eine hfl-Mutation, die den nicht rekombinanten gt10-Phagen nur lysogenes Wachstum erlaubt. Sie können also auf diesem Stamm keine Plaques ausbilden.

Für die eingesetzte poly(A⁺)-RNA ergaben sich 400.000 rekombinante, unabhängige Phagen. Um eine Aussage über die Länge der insertierten cDNA zu machen, wurden 24 Plaques ausgestochen, und die DNA nach Amplifikation aus diesen Phagen isoliert. Die mittlere Länge der DNA-Inserts lag bei 1,4-1,6 kbp, wobei auch insertierte DNA bis zu 2,6 kb gefunden wurde. Die Bibliothek wurde einmal amplifiziert. Der Titer für die eluierte Phagenlösung lag bei $1,6 \times 10^{10}$ pfu/ml.

3.6 Isolierung eines cDNA-Klones für das hnRNP-Protein C3

Von der erhaltenen cDNA-Bibliothek wurden 300.000 unabhängige Phagen zur ersten Identifizierung ausplattiert. Gleichzeitig wurden 300.000 Phagen der zur Verfügung gestellten λ gt11-cDNA-Bibliothek ausplattiert. Die Hybridisierung gegen das Oligonukleotid 4 ergab sechs positive Klone aus der hergestellten λ gt10-Bibliothek, sowie 9 bei der Suche in der λ gt11-Bibliothek. Diese λ gt11-Bibliothek wurde nur eingesetzt, da mit den Oligonukleotiden 1 und 2 weder in einer Northern-Analyse noch in einer Bibliotheks-suche eindeutige Signale zu finden waren.

Die Filterabzüge der cDNA- λ gt10-Bibliothek wurden nach Elution des gebundenen Oligonukleotides 4 für eine weitere Hybridisierung gegen endmarkiertes Oligonukleotid 7 eingesetzt. Aus dieser Suche ergaben sich 21 positive Klone. Die mit dem Oligonukleotid 4 erhaltenen positiven Klone aus der

erstellten λ gt10-cDNA Bibliothek erwiesen sich auch bei der Hybridisierung gegen das Oligonukleotid 7 als positiv.

In Abb. 8 und 9 sind die Restriktionen der isolierten DNA mit Eco RI und Bgl II/Hind III sowie die Hybridisierungen gegen die Oligonukleotide 4 und 7 gezeigt. Die Restriktion mit der Endonuklease EcoRI ergab, daß sich nur wenige positive Klone mit dem Enzym vollständig schneiden ließen. Dies ist vielleicht auf eine nicht korrekt verlaufende Ligation und auch auf unvollständige Restriktion zurückzuführen.

Aus diesem Grunde wurde die Restriktion der mit dem Oligonukleotid 7 positiven DNA mit zwei Restriktionsenzymen (BglII und Hind III) ausgeführt, die neben den EcoRI-Linkern in der λ -DNA schneiden. Von den so bestimmten In-

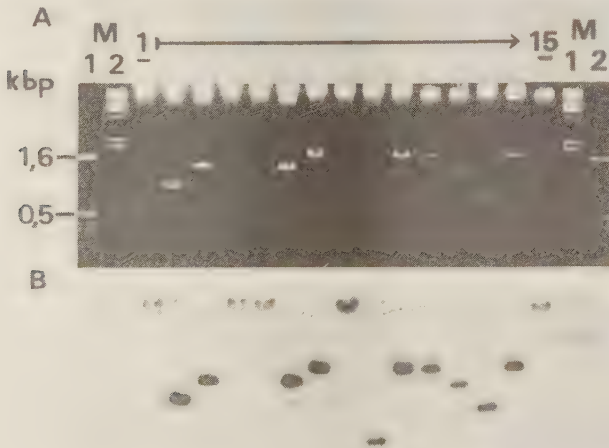


Abb. 8:

Hybridisierung des Oligonukleotides 4 gegen isolierte cDNA-Klone aus der hergestellten cDNA Bibliothek

Aus den mit dem Oligonukleotid 4 positiven Phagen wurde nach Amplifikation die DNA isoliert und nach Restriktion mit der Endonuklease EcoRI die DNA-Fragmente auf einem 0,8%igen Agarosegel getrennt (Abb. 8A). Nach dem Transfer auf eine Nylonmembran wurde gegen das radioaktiv endmarkierte Oligonukleotid 4 hybridisiert. Die Autoradiographie erfolgte für 2 h (Abb. 8B)

In den Gelbahnen 1-6 wurde die restringierte DNA der Klone λ cHW 4, -5, -6, -7, -10, -19 aufgetragen, in den Bahnen 7-15 die DNA der Klone aus der λ gt11-Bibliothek, und zwar die Klone λ cHW(11) 1-9

sertlängen müssen demzufolge 1,1 kbp subtrahiert werden. Die Längen der isolierten cDNA-Klone (λ CHW 1-21) lagen zwischen 0,6 bis 1,5 kbp.

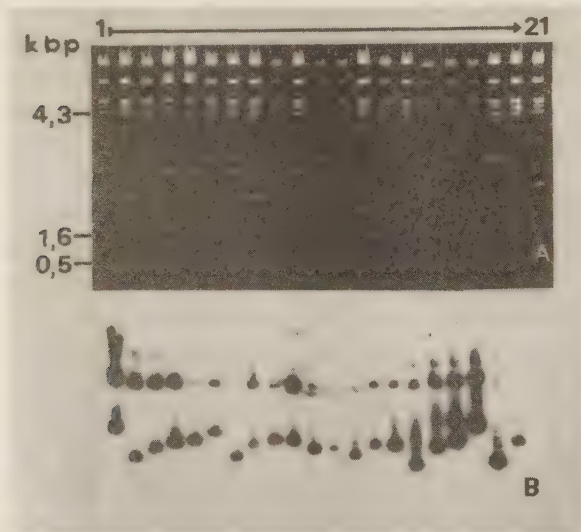


Abb. 9:

Hybridisierung des Oligonukleotides 7 gegen gelelektrophoretisch getrennte Fragmente der isolierten cDNA-Phagen

Von den nach der Hybridisierung gegen das Oligonukleotid 7 positiven Phagen wurde die DNA isoliert, und nach der Restriktion mit Bgl II und Hind III wurden die DNA-Fragmente auf einem 0,6%igen Agarosegel aufgetrennt (Abb. 10A). Die Numerierung der Gelbahnen entspricht der Numerierung der erhaltenen Klone λ CHW1-21. Anschließend wurde die DNA auf eine Nylonmembran transferiert und gegen das endmarkierte Oligonukleotid 7 hybridisiert (Abb. 10B). Die Autoradiographie erfolgte für 4 h.

3.7 Sequenz des isolierten cDNA-Klones

Anhand der Hybridisierungsdaten der Oligonukleotide an die isolierten Klone wurde der längste cDNA-Klon für die Sequenzierung ausgewählt, und jeweils von den EcoRI-Linkern teilweise in die cDNA sequenziert. Aus dem Sequenzvergleich des erhaltenen cDNA-Klons mit den zu dieser Zeit veröffentlichten Daten (Isolierung eines C3-cDNA-Klons aus einer λ gt11-Bibliothek mit den zuvor charakterisierten Antikör-

pern, Swanson et al, 1987) läßt sich eine Homologie für die beiden cDNA-Klone ableiten.

Wie Abb. 10 zeigt, ergibt der Vergleich im 5'-Bereich eine vollständige Homologie. Dies entspricht einem Teil des codierenden Bereichs. In der 3'-nicht translatierten Sequenz finden sich für den sequenzierten Bereich einige zusätzliche Basen, sowie ein Basenaustausch (G-A). Die Sequenzhomologie der Teilsequenz für den 5'-Bereich betrug 100 % und den 3'-Bereich 95 %.

Es kann sich also um einen natürlichen Polymorphismus im 3'-Bereich bzw. einen cDNA-Klon eines anderen Mitgliedes der C3-Genfamilie (siehe 3.3 und 3.8) handeln.

Da es nicht sinnvoll erschien, die komplette cDNA noch ein weiteres Mal zu sequenzieren, wurde mit dieser isolierten cDNA versucht, genomische Klone zu erhalten.

Abb. 10:

Sequenzvergleich des isolierten cDNA-Klons mit dem bekannten cDNA-Klon (Swanson et al., 1987)

Die Nukleotidsequenz des codierenden Stranges für den veröffentlichten cDNA-Klon ist dem selbst isolierten und teilweise sequenzierten cDNA-Klon gegenübergestellt. Homologien sind durch senkrechte Striche gekennzeichnet.

Die Striche unter der Sequenz geben die Positionen der benutzten Oligonukleotide, sowie deren Bezeichnung an.

[illegible]

[illegible]

3.8 Southernanalyse identifiziert Multigenfamilie

Zur Untersuchung der genomischen Anordnung wurden 20 µg der isolierten hochmolekularen HeLa-DNA mit den Endonukleasen Bam HI, Eco RI und Hind III inkubiert und dann elektrophoretisch getrennt. Die transferierte DNA wurde einer Hybridisierung gegen die radioaktiv markierte cDNA (2.10) unterzogen. Wie Abb. 11 zeigt, ergibt die Hybridisierung gegen den isolierten, radioaktiv markierten cDNA-Klon für die Verdauung der DNA für BamHI 4, EcoRI 11 und HindIII 12 verschiedene Signale. Bei Annahme einer totalen Verdauung (Versuch wurde zweimal wiederholt) der DNA sind die Fragmentlängen der hybridisierenden DNA sehr unterschiedlich, 2 bis 15 kb.

Die genomische Organisation für das hnRNP-Protein C3 in verschiedenen DNA-Bereichen sollte deshalb unterschiedlich sein. Diese Ergebnisse lassen die Vermutung zu, daß es sich bei den für das C3-Protein codierenden Bereichen um eine Multigenfamilie handelt, denn sonst würde man eine geringere Bandenzahl auf einem genomischen Southern erwarten können.

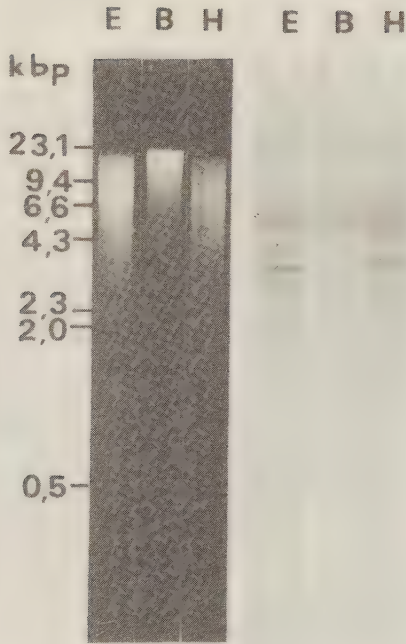


Abb. 11:

Hybridisierung des isolierten cDNA-Fragmentes an restringierte genomische HeLa-DNA

Jeweils 20 µg HeLa-DNA wurden mit 120 u Eco RI (E), Bam HI (B) und Hind III (H) restringiert und auf einem 0,6%igen Agarosegel getrennt. Nach dem Transfer auf eine Nylonmembran wurde die DNA gegen oligomarkiertes cDNA-Fragment hybridisiert. Die Membran wurde mit 0,1xSSC, 0,1 % SDS (w/v) bei 65°C für 0,5 h von nichtgebundener radioaktiv markierter DNA befreit. Die Autoradiographie erfolgte für 24h.

3.9 Isolierung genomischer Klone für das hnRNP-Protein C3

Der isolierte und von beiden Enden ansequenzierte cDNA-Klon wurde nach Oligomarkierung zur Identifikation genomischer

Klone eingesetzt. Für diese Suche wurde HeLa-DNA partiell mit der Nuklease Sau3A verdaut und in den Phagen EMBL3 kloniert.

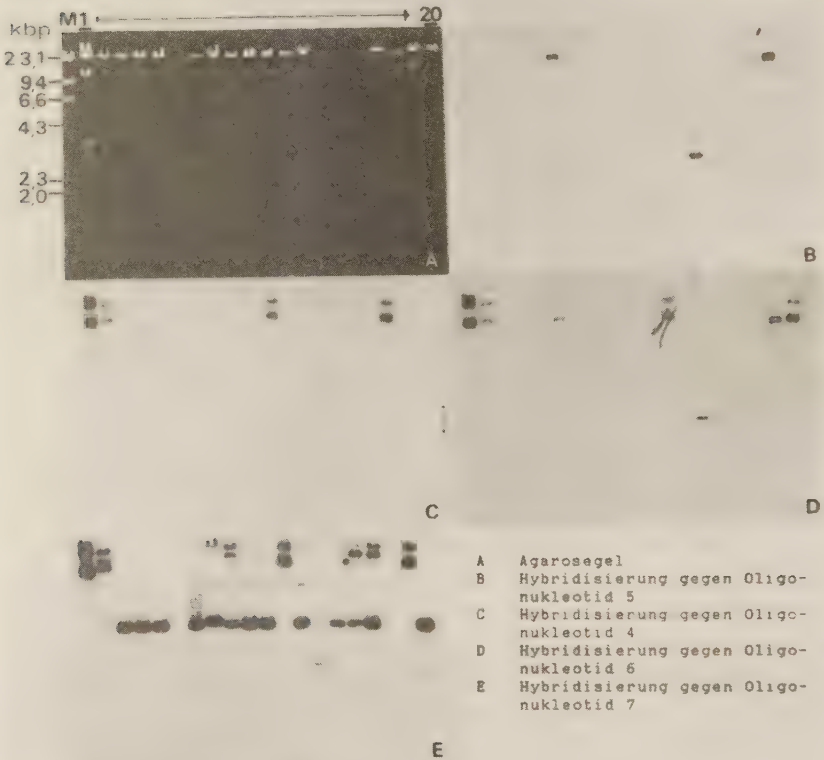


Abb. 12:
Hybridisierung der isolierten DNA aus den genomischen Klonen
gHM 1-20 gegen die endmarkierten Oligonukleotide 4, 5, 6 und 7

Die isolierte DNA der genomischen Klone gHM1-20 wurde nach Restriktion mit SalI und EcoRI auf einem 0,6%igen Agarosegel getrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Die Hybridisierung und Befreiung der Membran von ungebundener Radioaktivität erfolgte analog 2.12.

Die Autoradiographie für die Hybridisierung mit dem Oligonukleotid 4 wurde für 18 h ausgeführt. Für die Oligonukleotide 5, 6 und 7 wurde die Membran mit 2xSSC, 0,1 % SDS (w/v) gewaschen und für max. 10 h autoradiographiert.

Aus 360.000 genomischen Phagen konnten 60 positive Klone isoliert werden. Von diesen wurde die DNA präpariert und nach Restriktion mit den Endonukleasen Eco RI und Sal I gelelektrophoretisch aufgetrennt. Nach dem Transfer auf Membranen wurde die DNA gegen die zur Verfügung stehenden, endmarkierten Oligonukleotide hybridisiert. Wie die Abb. 12-14 zeigen, ergab sich aus den Hybrisierungsdaten für jedes Oligonukleotid ein unterschiedliches Muster. Diese Ergebnisse sind in Tabelle 4 zusammengefaßt

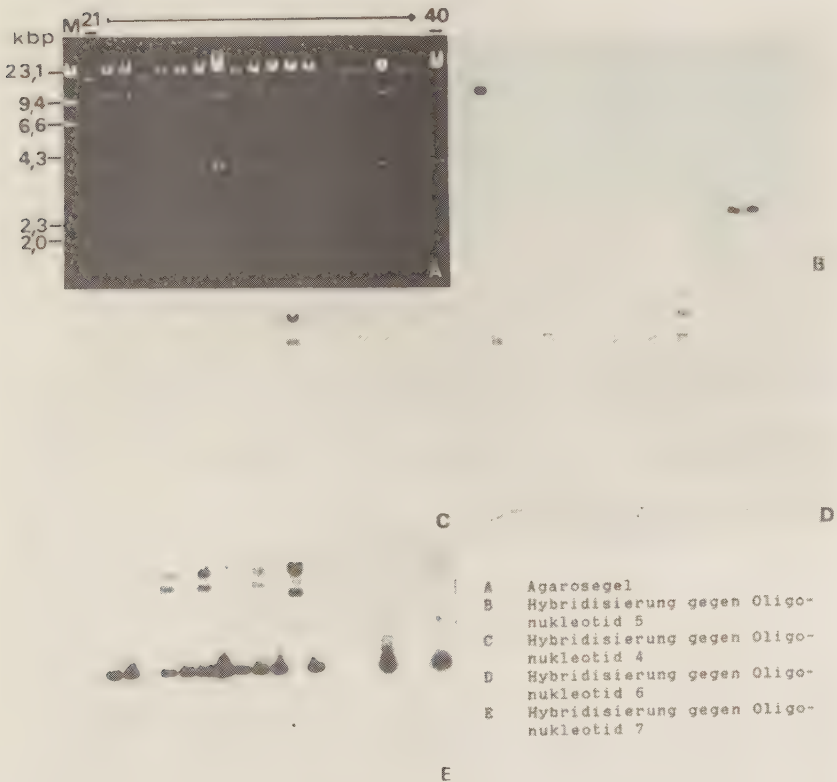


Abb. 13:

Hybridisierung der DNA aus den isolierten genomischen Klonen λ gHW 21-40 gegen die endmarkierten Oligonukleotide 4, 5, 6 und 7

Die Durchführung und Benennung entspricht der Abb. 12

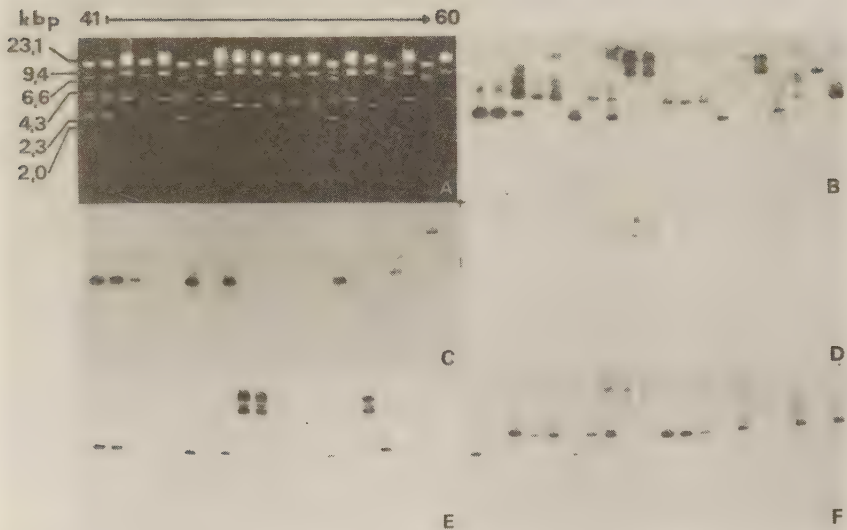


Abb. 14:

Hybridisierung der DNA aus den isolierten genomischen Klonen
 λgHW 41-60 gegen die endmarkierten Oligonukleotide 4, 5, 6 und 7

Die Durchführung ist analog Abb.12. Eine Teilabbildung gibt zusätzlich die Hybridisierung mit radioaktiv markierter cDNA an.

- | | |
|---|---------------------------------------|
| A | Agarosegel |
| B | Hybridisierung gegen cDNA-Klon |
| C | Hybridisierung gegen Oligonukleotid 5 |
| D | Hybridisierung gegen Oligonukleotid 4 |
| E | Hybridisierung gegen Oligonukleotid 6 |
| F | Hybridisierung gegen Oligonukleotid 7 |

Aus den erhaltenen Daten kann für die Hybridisierung mit den einzelnen Oligonukleotiden abgeleitet werden, daß es keinen genomischen Klon gibt, der mit dem 5'-Ende (Oligonukleotid 5), dem aus der für das Protein C3 erhaltenen Aminosäuresequenz abgeleiteten Oligonukleotid 4 und dem 3'-Ende des codierenden Bereiches (Oligonukleotid 7) hybridisiert. Das Oligonukleotid 5 liegt in der cDNA-Sequenz weiter stromaufwärts als der Beginn des isolierten cDNA-Klons. Das Oligonukleotid 4 sollte mit exprimierten Klonen hybridisie-

Tabelle 4:

Hybridisierung an genomische Klone

(+) bedeutet starke Hybridisierung, (+/-) schwache. Die Richtung der Oligonukleotide gegenüber dem cDNA Klon ist über diesen angezeigt. Die Position der einzelnen Oligonukleotide in der cDNA ist in Abb. 10 gezeigt.

Klon	cDNA	5'----->3'				Klon	cDNA	5'----->3'			
		Oligonukleotid Nr.						Oligonukleotid Nr.			
		5	4	6	7			5	4	6	7
λ gHH 14	+	+		+	+	λ gHH 11	+				+
λ gHH 35	+	+		+	+/-	λ gHH 13	+				+
λ gHH 36	+	+		+	+/-	λ gHH 15	+				+
λ gHH 41	+	+		+	+	λ gHH 16	+				+
λ gHH 42	+	+		+	+	λ gHH 17	+				+
λ gHH 46	+	+		+	+	λ gHH 20	+				+
λ gHH 48	+	+		+	+	λ gHH 22	+				+
λ gHH 54	+	+		+	+	λ gHH 23	+				+
λ gHH 1	+		+	+	+	λ gHH 25	+				+
λ gHH 2	+		+	+	+	λ gHH 26	+				+
λ gHH 12	+		+	+	+	λ gHH 27	+				+
λ gHH 19	+		+	+	+	λ gHH 28	+/-				+
λ gHH 32	+		+	+	+	λ gHH 29	+				+
λ gHH 49	+		+	+	+	λ gHH 30	+				+
λ gHH 50	+		+	+	+	λ gHH 31	+				+
λ gHH 6	+	+		+		λ gHH 33	+				+
λ gHH 21	+	+		+		λ gHH 37	+				+
λ gHH 57	+	+/-		+		λ gHH 40	+				+
λ gHH 59	+/-	+/-		+/-		λ gHH 44	+				+
λ gHH 18	+	+		+		λ gHH 45	+				+
λ gHH 39	+	+/-			+	λ gHH 47	+				+
λ gHH 43	+	+/-			+	λ gHH 51	+/-				+
λ gHH 56	+		+	+		λ gHH 52	+/-				+
λ gHH 3	+				+	λ gHH 53	+				+
λ gHH 4	+				+	λ gHH 55	+				+
λ gHH 5	+				+	λ gHH 58	+				+
λ gHH 7	+				+	λ gHH 60	+				+
λ gHH 8	+				+	λ gHH 24	+			+/-	
λ gHH 9	+				+	λ gHH 34	+				
λ gHH 10	+				+	λ gHH 38	+/-				

ren, da es aus einem Protein abgeleitet wurde.

Es gibt Klone, die mit dem Oligonukleotid 5, 6 und 7 hybridisieren, also den codierenden Bereich für das Protein vollständig abdecken sollten.

Weiterhin ergibt sich eine Gruppe, die mit den Oligonukleotiden 4, 6 und 7 hybridisieren. Diese geben einen Bereich des Proteins an, der von der Mitte des codierenden Teils bis zum C-terminalen Ende und möglicherweise darüber hinaus in den 3'-Bereich des Gens reicht. Diese Klone sollten also das

5'-Ende und den Bereich stromaufwärts nicht enthalten.

Eine weitere Gruppe von Klonen hybridisierte nur mit der cDNA und dem Oligonukleotid 7; diese repräsentieren nur solche Klone, die das 3'-Ende und weiter stromabwärts vom codierenden Bereich die genomische DNA enthalten.

Eine letzte Gruppe von Klonen stellen solche dar, die mit den Oligonukleotiden 5 und 6 hybridisieren, denen also das 3'-Ende des cDNA-Klons fehlt.

Da nicht bekannt ist, ob die genomische DNA für das Protein C3 Introns enthält, die zum Beispiel in Bereichen der Oligonukleotide liegen könnten, wurde ein Klon für die weitere Charakterisierung ausgewählt, der den codierenden Bereich anhand der Hybridisierung mit den Oligonukleotiden 5, 6 und 7 überspannt (Klon λ gHW 14). Für zwei weitere Gruppen wurden die Klone λ gHW 19 und λ gHW 31 zur näheren Charakterisierung genommen.

Eine Auswahl bei einer solchen Zahl von Klonen fällt schwer, da nach der Southernanalyse eine Genfamilie für das Protein C3 zu erwarten ist. Weiterhin ergibt die Northernanalyse zwei Transkripte mit 1,4 und 1,9 kb Länge, wobei möglicherweise die Transkripte für die verwandten Proteine C3 und C3x beide die gleiche Länge haben (siehe 3.3 und 3.4).

3.10 Charakterisierung der genomischen Klon λ gHW 14, λ gHW 19 und λ gHW 31

Die DNA des Phagen λ gHW 14, λ gHW 19 und λ gHW 31 wurden nach der Amplifikation in einer 500 ml LB- Kultur isoliert, mit verschiedenen Restriktionsenzymen verdaut und gelelektrophoretisch getrennt. Nach Transfer auf Membranen wurde die DNA mit verschiedenen markierten DNA-Proben hybridisiert.

Aus Abb. 15 ist zu ersehen, daß die DNA-Fragmente nicht unterschiedlich sind, die mit dem Oligonukleotid 5 bzw. 7 positiv hybridisieren. Dies legt die Vermutung nahe, daß es sich bei diesen Fragmenten um vollständige genomische Bereiche handelt, die insgesamt den codierenden Bereich für das hnRNP-Protein C3 überspannen. Die Hybridisierung mit der markierten cDNA ergibt ebenfalls kein weiteres DNA-Fragment, das nur mit der cDNA hybridisiert. Dies erlaubt den Schluß,

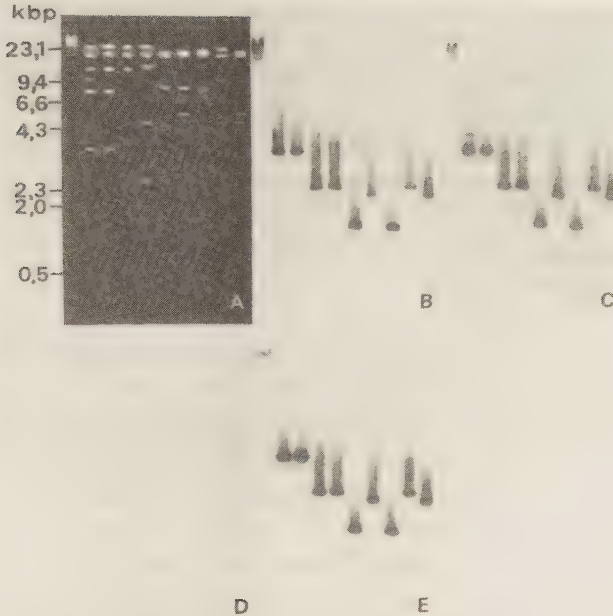


Abb. 15:

Hybridisierung von markierter cDNA und den markierten Oligonukleotiden 4, 5 und 7 an DNA des Klons λ gHH 14

Die DNA-Fragmente des Klons λ gHH 14 wurde nach Restriktion mit verschiedenen Endonukleasen auf einem 0,6%igen Agarosegel getrennt und auf Nylonmembranen transferiert. Die Hybridisierung erfolgte analog 2.12. Die unspezifisch gebundenen Fragmente der Hybridisierung gegen die cDNA wurden mit 0,2xSSC, 0,1 % SDS (w/v) von der Membran eluiert, die anschließende Autoradiographie erfolgte für 45 min. Das nicht hybridisierte Oligonukleotid 4 wurde mit 6xSSC, 0,1 % SDS (w/v) von der Membran eluiert. Die Autoradiographie erfolgte über Nacht. Für die Oligonukleotide 5, 6 und 7 wurde die Membran mit 2xSSC, 0,1 % SDS (w/v) gewaschen und für 10h autoradiographiert.

Gelbahn

- 1 Restriktion mit SalI
- 2 Restriktion mit SalI/BamHI
- 3 Restriktion mit BamHI
- 4 Restriktion mit BamHI/EcoRI
- 5 Restriktion mit EcoRI
- 6 Restriktion mit EcoRI/HindIII
- 7 Restriktion mit HindIII
- 8 Restriktion mit HindIII/BamHI
- 9 Restriktion mit EcoRI/SalI
- 10 Restriktion mit HindIII/SalI

- A Agarosegel
- B Hybridisierung gegen gegen oligomarkierte cDNA
- C Hybridisierung gegen Oligonukleotid 5
- D Hybridisierung gegen Oligonukleotid 6
- E Hybridisierung gegen Oligonukleotid 7

daß in dem Bam HI-DNA-Fragment mit einer Länge von etwa 3,5 kbp die vollständige Sequenz für das Protein C3 vorhanden sein sollte.

Die Hybridisierungsdaten für die Klone λ gHW 19 und λ gHW 31 sind im Anhang gezeigt. Auch bei diesen Klonen ergab die Hybridisierung immer nur ein Fragment, das mit den eingesetzten Hybridisierungsproben positiv reagierte.

3.11 Teilsequenzierung des BamHI-DNA-Fragmentes aus dem genomischen Klon λ gHW 14

Das ausgewählte Bam HI-Fragment aus dem genomischen Klon λ gHW 14 wurde in M13mp18- und M13mp19-DNA kloniert. Nach Subklonierung kürzerer DNA-Fragmente in die entsprechend restringierte DNA aus dem Phagen M13mp18, M13mp19 und Bluescript-DNA wurde die Sequenzierung nach der Methode von Sanger (1977) mit DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment) oder mit der modifizierten T7-DNA-Polymerase (SequenaseTM) ausgeführt.

In Abb. 16 ist die Sequenzierungsstrategie und die Nukleotidsequenz für einen Teil des BamHI-DNA-Fragmentes aus dem genomischen Klon λ gHW 14 angegeben. Die Sequenzierung erfolgte sowohl mit den eindeutigen Oligonukleotiden 5, 6 und 7, als auch mit dem M13-Sequenzierungsprimer für die einzelnen Klone. In der Abbildung ist die sequenzierte DNA aus dem genomischen BamHI-DNA-Fragment der publizierten cDNA-Sequenz gegenübergestellt (Sequenz siehe auch Anhang).

Abb. 16:

Teilsequenz des Klones λ gHW 14 in Gegenüberstellung mit dem bekannten cDNA-Klon (Swanson et al. 1987)

A Sequenzierungsstrategie

Die Restriktionsschnittstellen sind wie folgt abgekürzt: A AluI, B BamHI, E HaeIII, H HindIII, O XhoII, P PstI, R EcoRI, S Sma I, U Sau3A, V PvuII, X XbaI. Die Markierung 5, 6 und 7 entsprechen den Positionen der benutzten Oligonukleotide.

B Nukleotidsequenz des codierenden Stranges für den genomischen Klon

Die abgeleitete Proteinsequenz ist oberhalb der DNA-Sequenz darge-

R M I A G Q V L D I N L A A E P K V N R G K A G V K R S A V
 TAGAATGATTGCTGGCAGGTTTATAGATATTAACCTGGCTGACAGGCCAAAGTGAACCTGGGAAAAGCAGGCTGAAACGATCTGCACT 807
 CAGAAATGATTGCTGGCAGGTTTATAGATATTAACCTGGCTGACAGGCCAAAGTGAACCTGAGGAAAAGCAGGCTGAAACGATCTGCACT
 R M I A G Q V L D I N L A A E P K V N R G K A G V K R S A A
 E M Y S S S F H L G Y D Q G D Y D M Y S Y S A R V P P
 GGAGATGTATAGCTCTCTTTTCACTTGGGCTATGACTATCAAGGTGATTATGATGACACGATGTACAGTACTCAGCAGCTGTGCTCTC 897
 GGAGATGTACGGCTCTCTTTTCACTTGGGCTATGACTATCAAGGTGATTATGATGACACGATGTACAGTACTCAGCAGCTGTGCTCTC
 E M Y G S S F D L D Y D F Q R D Y Y D R M Y S Y P A R V P P
 P P P I A A V V L S K R Q R V S G N T S * R G K S G I N S
 TCCTCCTCCTATTGCTTGGGCTGAGTGTCTCAAAACGTCAGCGTGATCAGGAAACACTCATGAGGCGGCAAAAGTGGCTCAATTC 987
 TCCTCCTCCTATTGCTTGGGCTGAGTGTCTCAAAACGTCAGCGTGATCAGGAAACACTCATGAGGCGGCAAAAGTGGCTCAATTC
 P P P I A R A V V P S K R Q R V S G N T S R R R G K S G F N S
 K S G Q G S S K S G K L R G D D L Q A I M K E L T Q I K Q
 TAAGAGTGGACAGCAGGATCTTCCAAGCTGGAAGTTGAGAGGAGATGACCTTCAGGCCATATGAAAGGAGTTGACCCAGATAAAACA 1077
 TAAGAGTGGACAGCAGGATCTTCCAAGCTGGAAGTTGAGAGGAGATGACCTTCAGGCCATATGAAAGGAGTTGACCCAGATAAAACA
 K S G Q R G S S K S G K L K G D D L Q A I K K E L T Q I K Q
 K V D S L L E N L E K I E K E Q S K H A V E M R N D K S E F
 AAAAGTGGATTCTCTCTGGAAAACTGGAAAAAATTGAAAAAGGAACAGAGCAACACGCACTAGAGATGAGGAATGATAAGTCAGAAAGA 1167
 AAAAGTGGATTCTCTCTGGAAAACTGGAAAAAATTGAAAAAGGAACAGAGCAACACGCACTAGAGATGAGGAATGATAAGTCAGAAAGA
 K V D S L L E N L E K M E K E Q S K Q A V E M K N D K S F E
 E Q S S S S V K K D E T N V K M E S F G A D D A E G D
 GGAGCAGAGCAGCAGCTCCGTGA AAGATGAGACTAATGTGAAGATGGAGTCTGAGGCGGCTGCAGATGACTGTGCTGAGAAGGCGGA 1256
 GGAGCAGAGCAGCAGCTCCGTGAAGAAAGATGAGACTAATGTGAAGATGGAGTCTGAGGCGGCTGCAGATGACTGTGCTGAGAAGGCGGA
 E Q S S S S V K K D E T N V K M E S E G G A D D S A F E G D
 L L D D D D N E D G D D Q L E L I K D D F K E A F F G F D
 CCTACTGGATGATGATGATAATGAGAT GGGGGGATGACCAGCTGGAAGTTGATCAAGGATGATGAAAAAGAGGCTGAGGAAGGAGAGGA 1345
 CCTACTGGATGATGATGATAATGAGATCGGGGGATGACCAGCTGGAAGTTGATCAAGGATGATGAAAAAGAGGCTGAGGAAGGAGAGGA
 L L D D D D N E D R G D D Q L E L I K D D F K E A E E G F D
 T
 D R D S N G M D D S *
 TGACAGAGACAGACCAATG GCATG GATGACTCTTAAGCACATAGT GGGTTTAGAAATCTTATTCATTATTTCTTTACCTA 1427
 TGACAGAGACAGCGCAATGAGGATGACTCTTATGACTCTTAAGCACATAGTGGGTTTAGAAATCTTATTCATTATTTCTTTACCTA
 D R D S A N G G
 GGCACCTGTCTAAGATCAAAATTTTACCAGA GCTCTCACCTAGTATCTTTGGCAGATGCTCAGTGTCTTCCATCCTTGTCTTTCC 1516
 GGCCTGTCTAAGATCAAAATTTTACCAGATCCTCTCCCTAGTATCTTCAGCAGATGCTCAGTGTCTCTCCATCCTTGTCTTTCC
 ATGTTTATTAAATCATATTGCCCTGCCTAGTCCCAATTTCACTTCCTTTGGCACTCTTAGTAGTCTTTGTTAAGTCTTACCTTGAATA 1606
 ATGTTTCAATAATTCATATTGCCCGCGCTAGTCCCAATTTCACTTCCTTTGACGCTCCTAGTAGTCTTTGTTAAGTCTTACCTTGAATA

```

TTTTAAATTTTGATACCTCTTTATGACIT  AATAAAAAGGATGTATGGTTTTATCAACTGTCTCCAAAATAATCTCTTGTTAT  1493
TTTTAAATTTTGATACCTCTTTATGACTTAACAATAAAAAGGATGTATGGTTTTATCAACTGTCTCCAAAATAATCTCTTGTTAT

GGAGGACAGTTCTCTTTTCATTCATACATAAGTTCAGTAGTTGCTTCCCTGACTGCCAAAGGCAAGCTTATTTAGTTGAGTAGCTCCTG  1783
GGAGTACAGTTCTCTTTTCATTCATACATAAGTTCAGTAGTTGCTTCCCTAAGTGCAAAAGGCAATCTCATTTAGTTGAGTAGCTCTTG

TAGCTTTTGA  TTGAAGATATGTGTGTACACCCCTCAGATTAGTGTGTGTGTGTGGGGCAGTTCAACACAAATGTAAACAATGTATTTT  1872
TAGCTTTGAGTTAGAAGTATGTGTGTACACCTTCAGATTAGTGTGTGTGTGGGGCAGTTCAACACAAATGTAAACAAT  TATTTT

AATGAGAGTTGGCAATGCAAAATGCACTCTTAGAAAAATAATAGAGTGTATAGTCTTAAGATTGTCTTAAAGTTGACTACTGTG  1962
AATGAGAGTTGGCATGTCAAATGCATCCTCTAGAAAAATAATAGAGTGTATAGTCTTAAGATTGTCTTAAAGTTGTATAC  TG

ATTTTGTGAALAGTTGATGTTGGGAAGTTTTTTTCTCAAAATAAACAGTCTCTTATTAAGCAGGAATTTGGAGGAAAAAAA  2052
ATTTTGTGAALAGTTGATGTTGGGAAGTTTTTTTCTCAAAATAAACAGTCTCTTATTAAGCAGGAATTTGGAGGAAAAAAA

CTGTTTTTAAGATTTTGATATTTATTTATTTGTTTACTTCAAACTCTTTGTTTTATAGAGAGTCTCTCCACAAAACCTCCAGAGCTACT  2142
AATTC

ATATTTTTCTTGAAGTCATAATCATTTATGCATACCAACATAACACTACTCAAATTCATTTTCATTGAGATGCAATGTTGCATTGAAG  2232
AATAAAGTTCAGAGAGAGAGTGGAGATTTGTTTTTCAAAATGGCTTTTACATCTTAATGAAGTTTGGGAAGTATAGCTCTCTTCGCTT  2322

CAGTGTCTTTGTGTCTCAGTGGGACCTTTTTTGAAGTTTTTGTGTGTGTCTAAATGTCTTTGTCTTTAAATAGGAGAGGCTCAAA  2412
TAAGATTTCAAGAAAAATGCAAGAGCTGGAAAAATGGAACCTCTGCTTTCTCTATTTTGTCTTTTAAATAGTATTTATAGCCAG  2502
CCTTTGTAATTTGAAGTGTATCTTCAATGTTACTGAAACCAAGAAAAATCTTATTTCTGTGATTTCCATAGTCTGCTCTCCAG  2592
TGAGAACATAGAAATGTTACACATTTATTTTACCTTAAATAATCTTTTACTCATATTAGCTAATCTTTGTGTTTTCTCTCAACT  2682
AATTCAGAGTATGATTTTATGATTCAGTCTTCTTAAGATGAATACATTAATAGCTACAGTGTGTGTGATACCTCATCTTG  2772
CTTAGTTCATTTTGTGTTTTATGCTTCAGTTTTTTCAGCAGAGAGAAAAATGGCATATATAATTTTGTGTACACAAACCTTTGGAT  2862
TCATAGAAGTATGCTATTTGTTTCTATAG  2896

```

Für den codierenden Teil ist die aus dem sequenzierten genomischen Klon abgeleitete Aminosäuresequenz sowie die publizierten Aminosäuresequenz angegeben. Einzelne Basenaustausche und Einschübe sind in den Sequenzen sichtbar. Für das Nukleotid 960 ergab auch eine wiederholte Sequenzierung ein T anstelle eines C's. Somit wird der Leserahmen abgebrochen, bevor er das Ende der bekannten Aminosäuresequenz erreicht. Dies könnte ein Klonierungsartefakt sein, da der

Leserahmen nach diesem Nukleotid weiter "offen" ist und der bekannten Sequenz entspricht.

Weiterhin läßt sich im Bereich um die Nukleotide 1192 und 1285 für die in der Sequenz vorkommenden Oligonukleotide A, und G, die Anzahl der Nukleotide auch nach mehrfacher Sequenzierung nicht eindeutig festlegen, so daß der nachfolgende Leserahmen unsicher bleibt. In Abb. 17 sind die angeführten Bereiche aus einzelnen Sequenziergelen zur Verdeutlichung gezeigt.

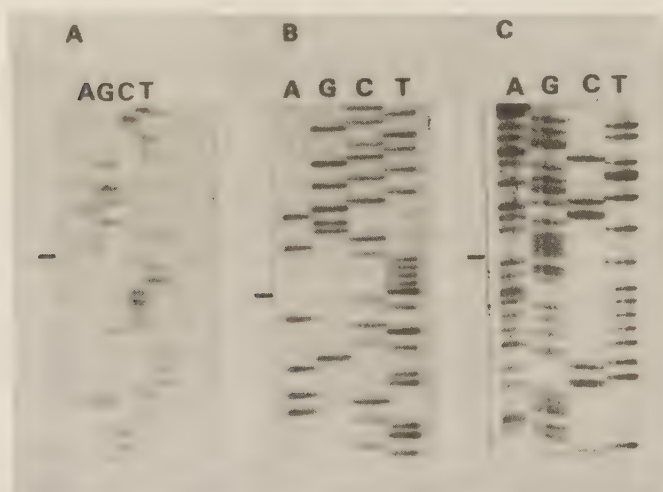


Abb. 17:

Sequenzierung der kritischen Bereiche des Klonen λ gHH 14

Die Klone, ausgehend von den Schnittstellen XhoII, PvuII, wurden sequenziert und Ausschnitte für die Bereiche um die Nukleotide 960 (Teilabb. A), 1192 (Teilabb. B) und 1287 (Teilabb. C) sind gezeigt. Die Anordnung für die Nukleotide A, G, C und T ist jeweils über den einzelnen Gelbahnen angegeben. Die Sequenz des Bereichs um das Nukleotid 963 und 1192 sind hierbei als Gegenstrang zu lesen. Die seitlichen Markierungen geben die Positionen für die fraglichen Sequenzbereiche an.

Ein Bereich in der cDNA-Sequenz nahe dem 5'-Ende ist in dem genomischen Klon nicht vorhanden (zwischen Nukleotid 469 und 470 fehlen in der genomischen Sequenz 26 Basen, die in

der cDNA-Sequenz vorhanden sind). Im 3'-Bereich ergeben sich viele Abweichungen gegenüber dem cDNA-Klon.

Die verwandten Sequenzen des genomischen Bereichs und des mittlerweile publizierten cDNA-Klon (Swanson et al., 1987) ergeben eine Homologie. Auf Nukleinsäurebasis beträgt diese 92 %. Für die Aminosäuren liegt die Homologie bei 87 %, wobei in diesem Falle anzuführen ist, daß die Berechnung erst über einige Annahmen gemacht werden konnte. So wurde für die fraglichen Homopolymeren jeweils ein Nukleotid mehr angenommen. Diese Annahmen und Ergebnisse ändern jedoch nichts an dem Basenaustausch bei Nukleotid 960, der zum Stopcodon führt. Diese Base in der Sequenz bricht den bis dahin offenen Leserahmen ab.

Das isolierte, genomische BamHI-DNA-Fragment hat noch in einer weiteren Beziehung ein besonderes Merkmal. Ab dem Nukleotid 320 sowie 2042 gibt es eine 11 Basen lange Wiederholung ("repeat") der Nukleotidsequenz GAGGAAAAAAA (in Abb. 16 durch Klammern gekennzeichnet). Im 5'-Bereich liegt diese Sequenz 100 bp vor dem Beginn der bekannten cDNA-Sequenz. Die Lage des 5'-Endes der mRNA stimmt mit den Ergebnissen der "primer extension"-Versuche überein. Im 3'-Bereich der Wiederholung findet man einen Basenaustausch (G-A) zwischen der Sequenz in genomischen Bereich und der cDNA-Sequenz.

3.12 Bestimmung der Chloramphenicolacetyltransferase- (CAT)-Aktivität

Aus den Daten der "primer-extension"-Versuche kann abgeleitet werden, daß die Position des 5'-Ende der mRNA etwa 600 Basen vor der Position des Oligonukleotides 2 liegt (3.4). Dies würde bedeuten, daß ein 420 bp langes SmaI-DNA-Fragment den Transkriptionsstart enthalten sollte, wobei in dieser Sequenz eine CAAT-(Pos. 136)- und TATA-(Pos. 185)-Box zu finden ist.

Das 420 bp lange SmaI-DNA-Fragment wurde in das mit der Nuklease BglII-linearisierte und mit DNA-Polymerase I Klenow Fragment aufgefüllte Plasmid pCAT3N kloniert. Dieses konstruierte Plasmid sollte bei einem aktiven Promotor mit dem fusionierten CAT-Gen ein Signal für die CAT-Aktivität geben

(2.17). HeLa-Zellen wurden mit diesem Konstrukt transfiziert. Analog erfolgten die Transfektionen mit den Plasmiden pSV2-CAT als Positiv- und pCAT3N Negativkontrolle. Das Plasmid pCAT3N enthält vor dem CAT-Gen keinen aktiven Promotor, das Plasmid pSV2-CAT den Promoter aus dem viralen SV40-

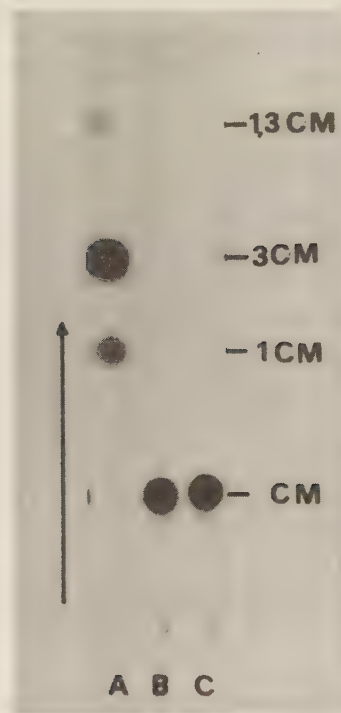


Abb. 18:
CAT-Aktivitätsbestimmung

Die Plasmide pSV2-CAT, pCAT3N und das Konstrukt aus dem 420 bp langen SmaI-DNA-Fragment und pCAT3N wurden in HeLa-Zellen transfiziert. Nach Aufbrechen der Zellen wurde mit dem Überstand eine CAT-Aktivitätsbestimmung durchgeführt. Nach Dünnschichtchromatographie folgte eine Autoradiographie über Nacht. Die seitliche Markierung gibt die Position von Chloramphenicol (CM) bzw. 1- oder 3-Acetylchloramphenicol (1-, 3CM) und Diacetylchloramphenicol (1,3CM) an.

Spur A	Plasmid pSV2-CAT
Spur B	Plasmidkonstrukt
Spur C	Plasmid pCAT3N

Genom. Nach Aufbrechen der transfizierten Zellen wurden die einzelnen Überstände zur Bestimmung der CAT-Aktivität eingesetzt. Die Autoradiographie der Dünnschichtchromatographie ist in Abb. 18 gezeigt.

Für das klonierte SmaI-DNA-Fragment ergibt die Analyse, daß es sich bei dieser DNA-Sequenz nicht um einen aktiven Promotor handelt. Die beiden Kontrollplasmide entsprechen in ihrem Ergebnis dem zu erwartenden: pSV2-CAT zeigt Aktivität im Gegensatz zu dem Plasmid pCAT3N.

4 Diskussion

Die Reifung der hnRNA zur mRNA im Kern beinhaltet das Spleißen von Introns und Zusammenfügen der Exons sowie den Transport der mRNA ins Cytoplasma. Die hnRNA ist während dieses Prozesses mit Proteinen komplexiert. Bereits cotranskriptional wird sie durch die sogenannten hnRNP-Proteine in fibrilläre (7 nm) und partikuläre (25 nm, 40 nm) Strukturen verpackt (Beyer et al. 1980, Ostheim et al., 1985). Die Vermessung von einzelnen Transkripten anhand elektronenmikroskopischer Aufnahmen zeigt 40 nm Partikel an den Spleißstellen. Bei diesen Partikeln könnte es sich um die sogenannten Spleißosomen handeln, die als 60S Partikel für Globin- und Ad2-virale-prä-mRNA nachgewiesen werden (Choi et al., 1986, Bindereif et al., 1986, 1987). In diesen Partikeln sind neben anderen Proteinen, z.B. snRNPs, auch die oben erwähnten hnRNPs zu finden, was über Antikörper gegen hnRNP-Proteine gezeigt werden kann (Bindereif et al., 1986, Sierakowska et al., 1986, Choi et al., 1986).

Da die gleichen Antikörper den Spleißprozeß inhibieren, liegt die Hypothese nahe, daß hnRNP-Proteine nicht nur den nukleolytischen Abbau des Primärtranskriptes verhindern, sondern vielleicht auch für die korrekte Anordnung von Exon/Intron- sowie Intron/Exonübergängen während des Spleißens verantwortlich sind.

Für die Zusammensetzung der hnRNP-Partikel aus ruhenden Zellen (Lymphozyten) ist gezeigt, daß einzelne Proteine entweder ein anderes Modifizierungsmuster tragen oder nicht nachweisbar sind (Gabaldon de Koch, 1983). Da in in vitro Rekonstitutionsexperimenten (Wilk, 1984) mit isolierten hnRNA-Proteinen aus diesen Zellen auch die Aggregation zu 40S-Partikeln langsamer verläuft, könnte dies bedeuten, daß die Spleißeffizienz reduziert ist, und prä-mRNA langsamer prozessiert wird.

4.1 Auswahlkriterien für die Analyse einzelner hnRNP-Proteine

In eigenen Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe wurde die

Zusammensetzung der 40S-Partikel untersucht. Es konnten 17 Proteine unterschieden werden und in ihrer Aminosäurezusammensetzung bestimmt werden (Wilk et al., 1983, Werr, 1984, Wilk et al., 1985). In einer aktualisierten Analyse (Piñol-Roma et al., 1988) sind mittlerweile etwa 30 Proteine als Bestandteil der Komplexe identifiziert worden.

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, lassen sich die Komponenten des 40S-Partikels in 3 Gruppen (A, B und C, Beyer et al., 1978) mit mehreren Spezies einteilen (Suria et al., 1979, Peters et al., 1980, Wilk et al., 1983, 1985). Für drei Proteine, die basischen A1, A2 und das saure C3, wurden innerhalb dieser Arbeit Aminosäuresequenzdaten erstellt, da sie besonders interessante Funktionen während der Reifung der hnRNA wahrnehmen. Die Auswahlkriterien sind im folgenden kurz erläutert.

Die Proteine A1 und A2 gehören zur basischen Gruppe und sind anhand ihrer Aminosäurezusammensetzung sehr ähnlich (Werr, 1984). Wenn Proteine dieser Gruppe durch Antikörperfällung aus einem in vitro Spleißextrakt entfernt werden, ist die hnRNA-Reifung inhibiert (Mayrand et al., 1986, Siarakowska et al., 1986, Choi et al., 1986). Während das Protein A1 in Abhängigkeit vom Zellzyklus exprimiert wird (LeStourgeon et al., 1978, Gabaldon de Koch, 1983), scheint Protein A2 konstitutiv ausgeprägt zu sein. A2 ist weiterhin am Matrix gebundenen Transport der RNA ins Cytoplasma beteiligt (van Eekelen et al., 1981). Es kann auch in größeren Mengen im Cytoplasma nachgewiesen werden (Celis et al., 1986).

Im Gegensatz dazu ist C3 ein saures hnRNP-Protein, gegen das monoklonale Antikörper hergestellt worden sind (Choi et al., 1984). Dieser Antikörper inhibiert in vitro den Spleißvorgang vollständig (Choi et al., 1986).

Da die Proteine einen modifizierten Aminoterminus besitzen (Billings et al., 1978), können Sequenzdaten nur mit internen Teilpeptiden erstellt werden. Hierzu ist generell die Protease aus *Staphylococcus aureus* V8 verwendet worden, die nach der Aminosäure Glu spaltet. Da die proteolytische Spaltung unter teildennaturierenden Bedingungen durchgeführt wurde, sind die oberflächlichen Glutamatreste als Spaltstelle bevorzugt. Daraus erklären sich die in Abb. 2 beobachte-

ten Spaltpräferenzen.

Aus den Aminosäuresequenzdaten für das Protein C3 wurden Oligonukleotide abgeleitet, synthetisiert und zur Isolation von cDNA- bzw. genomischen Klonen verwendet (siehe 3.2).

Die erstellten Sequenzdaten (Tab. 1) ergeben für das Protein A1 eine interessante Homologie zu einem Protein mit anderer Funktion, auf die im folgenden Abschnitt näher eingegangen wird.

4.2 Homologie eines hnRNP-Proteins zu DNA-bindenden Proteinen

Die erstellte Aminosäuresequenz für das Peptid A1/II, welches ca. 13 kD groß ist (siehe Abb. 2), erstreckt sich über 30 Aminosäuren. Beim Vergleich mit anderen Proteindaten wurde eine vollständige Homologie zu einer cDNA-Sequenz des Proteins UPI gefunden. Dieses entwindet DNA-Helices ("unwinding protein I", Riva et al., 1986, Cobianchi et al., 1986).

UPI ist ein 195 Aminosäuren langes Protein (Williams et al., 1985), für das vollständige cDNA-Klone identifiziert sind (Riva et al., 1986, Cobianchi et al., 1986). Beim Vergleich der bekannten Aminosäuresequenz mit dem offenen Leserahmen der cDNA-Klone ergibt sich, daß dieser nicht nur 195 Tripletts, sondern 320 Aminosäuren umfaßt. Das UPI-Protein stellt die N-terminalen 195 Aminosäuren dieses offenen Leserahmens dar.

Für diesen Befund gibt es zwei Möglichkeiten: entweder dieses Transkript codiert nicht für UPI, oder UPI ist ein Prozessierungsprodukt eines längeren Proteins. Für die zweite Möglichkeit gibt es mehrere Anhaltspunkte:

1. Antikörper gegen UPI kreuzreagieren mit basischen hnRNP-Proteinen (Valentini et al., 1985),
2. die Sequenzhomologie zwischen UPI und dem Teilpeptid A1/II über 11 Aminosäuren (Riva et al., 1986).

Das hnRNP-Protein A1 wird durch V8-Protease in zwei Teile gespalten, wobei das N-terminale Hauptpeptid A1/I 25 kD groß ist und wegen Blockierung des N-Terminus nicht sequenziert werden kann. Es ist etwas kleiner als das Molekulargewicht von UPI. Dies kann durch die fehlenden 11 Aminosäuren des Teilpeptides A1/II erklärt

werden. Die ersten 11 Aminosäuren des Teilpeptides A1/II sind vollständig homolog zum Carboxyterminus von UPI.

3. Die weiterführenden 19 Aminosäuren des Teilpeptides A1/II folgen im Leseraster der isolierten cDNA-Klone direkt nach dem Abbruch der Homologie zu UPI.

Eine mögliche Erklärung für diese Sequenzhomologie wäre, daß der isolierte cDNA-Klon für das Protein A1 codiert, und UPI, wie oben bereits angeführt, der N-terminale Teil (Aminosäure 1-195) des hnRNP-Proteins A1 wäre. Unterstützend für diese Hypothese sind experimentelle Befunde, daß UPI bei der Aufreinigung von hnRNP-Proteinen als endonukleolytisches Spaltprodukt entstehen kann (Pandolfo et al., 1985).

Unter der Voraussetzung, daß die Annahme richtig ist und A1 eine Vorstufe von UPI darstellt, muß das hnRNP-Protein A1 mehrere funktionelle Regionen besitzen: erstens die Fähigkeit der Aggregation mit anderen hnRNP-Proteinen zu den hnRNP-Partikeln (d.h. Proteinerkennung), und zweitens Erkennung von Nukleinsäure.

Bezüglich der Erkennung von Nukleinsäure lassen Dissoziationsstudien in Abhängigkeit von der Ionenkonzentration unterschiedliche Affinitäten von A1 zu RNA und UPI zu DNA zu. Das Protein A1 dissoziiert aus hnRNP-Partikeln bereits bei 0,1 M NaCl, während UPI an DNA bis zu einer Konzentration von 0,5 M NaCl bindet (Beyer et al, 1978, Chase et al., 1986).

Dies kann durch konformative Veränderungen gegenüber dem A1-Protein erklärt werden. Es ist allerdings nicht auszuschließen, daß hnRNP-Protein A1 nur geringe Kontaktmöglichkeiten mit der hnRNA besitzt und hauptsächlich über Protein-Protein-Wechselwirkung an die Partikel bindet.

Für die Aggregation zu hnRNP-Partikeln könnte dabei der C-Terminus entscheidend sein. Ähnliches ist für das SSB-Protein ("single strand binding") aus E.coli beschrieben, das normalerweise als Tetramer in der Zelle vorliegt. Nach Abspaltung der C-terminalen Domäne bindet das N-terminale Fragment als Monomer an DNA. Auch hier scheint die C-terminale Domäne für die Protein-Protein-Wechselwirkung verantwortlich zu sein (Chase et al., 1986).

UPI entspricht der N-terminalen Sequenz von A1. In diesem Abschnitt wird die RNP-Box (Lys/Arg-Gly-Phe-Gly/Ala-Phe-Val-

X-Phe/Tyr) zweimal gefunden, die aus dem Vergleich RNA-bindender Proteine aus Nukleus bzw. Cytoplasma abgeleitet werden kann (Swanson et al., 1987, Dreyfuss, 1988). Ob diese Sequenz für die Nukleinsäurebindung wichtig ist, kann aus den bisher vorliegenden experimentellen Daten nicht eindeutig geschlossen werden.

Eine ähnliche Vorläuferverwandtschaft wie für A1 und UPI wird auch für das Protein A2 und das helixdestabilisierende Protein UPI-B aus Kälberleber und HDPI aus Mausmyelomazellen gefunden (Kumar et al., 1986). Die Sequenz eines hnRNP-Proteins aus der C-Klasse (Isolierung durch Antikörper gegen hnRNP-Proteine; die Antikörper reagieren jedoch nicht mit den sauren Proteinen C3, C3X (Kumar et al., 1987)) zeigt eine Verwandtschaft mit einzelnen Proteinsequenzen des Proteins UP2 (unwinding protein 2, Lahiri et al., 1986). Für dieses Protein ist jedoch noch nicht eindeutig entschieden, ob es dem hnRNP-Protein C1 oder C2 entspricht. Proben dieses Proteins erscheinen auf 2d-Gelen an der Stelle des Proteins C2 (B. Henrich, persönl. Mitteilung).

4.3 cDNA-Klonierung

Eine weitere Aufgabe während dieser Arbeit war die Erstellung einer cDNA-Bibliothek für HeLa-mRNA. Es wurde als Vektor für die cDNA der Phage λ gt10 ("generalized transducer") gewählt, da die Handhabung einer Bibliothek in einem Phagen leichter ist als eine, die in Plasmid kloniert ist. Bei diesem DNA-Vektor ist es nötig, die lange, rekombinierte DNA zu verpacken, um eine ausreichend hohe Infektionsrate gegenüber einer Transformation mit DNA zu bekommen. Hierzu wurde ein effizientes Verpackungssystem nach Enquist et al. (1979) hergestellt. Neben der Beschallung des "sonic extracts" wurde auch das "freeze thaw lysate" mit Ultraschall behandelt, um in diesem Lysat ebenfalls die verpackbare λ -DNA ("cos"-Stelle in einem ausreichenden Abstand) zu scheitern. In einem Verpackungsansatz können ohne exogen zugefügte λ -DNA keine Phagen gebildet werden.

Eine möglicherweise effizientere Methode zur Herstellung von Verpackungslysate wurde von Rosenberg et al. (1985) veröffentlicht. Eine Bakterienmutante mit deletierten "cos"-

Stellen erübrigt in diesem Lysat jede notwendige Denaturierung der DNA, da keine verpackbare ("cos" in notwendigem Abstand) λ -DNA in diesem Lysat vorhanden sein kann.

Die Verpackungseffizienz ist den in der Literatur angegebenen Werten gleich (Maniatis et al., 1982). Eine weitere Verbesserung für die Herstellung der Lysate kann in einer schnelleren und effizienteren Induktion der lysogenen Phagen liegen. Hierzu kann das Vermischen eines bestimmten Volumens 95°C heißen Mediums mit dem 30°C warmen Anzuchtmedium führen.

Eine cDNA-Bibliothek für HeLa-mRNA wurde während dieser Arbeit in λ gt10 erstellt. Nach der Erststrangsynthese wurde über RNaseH und Polymerase I eine möglichst vollständige Synthese des komplementären Stranges erreicht. Diese Art der Synthese hat den Vorteil, den Einsatz der Nuklease S1 zu erübrigen, die nicht nur die "hairpin"-Strukturen beseitigt, sondern nebenbei auch bereits revers transkribierte DNA verdauen kann.

Nach Fertigstellung der cDNA-Bibliothek wurden neuere Methoden veröffentlicht, die zum großen Teil die während der Synthese notwendigen Fällungen der Nukleinsäuren vernachlässigen. So wird zum Beispiel die cDNA-Erst- und Zweitstrangsynthese, sowie die Auffüllreaktion nach dieser Methode in einem Reaktionsgefäß hintereinander ohne Fällungen durchgeführt (focus BRL, 9 (1987)). Die Verluste aufgrund der zahlreichen Präzipitationen werden somit verringert. Der Einsatz von DNA-Adaptoren im Gegensatz zu den hier benutzten DNA-Linkern ermöglicht es, auf die Methylierung der cDNA für das entsprechende Restriktionsenzym zu verzichten, da die heute erhältlichen Adaptoren nur einmal an die beiden Enden der cDNA ligiert werden können. Eine Restriktion der Adaptoren entfällt somit. Die Nukleinsäure nach der beschriebenen Methode wird schließlich nur dreimal gefällt, im Gegensatz zu der in der Arbeit verwendeten Methode, die 7 Präzipitationen beinhaltete.

4.4 cDNA-Isolierung und Transkriptanalyse

Die erhaltenen Sequenzdaten für das Peptid C3/II wurden zur

Ableitung von degenerierten Oligonukleotiden eingesetzt (siehe 3.2). Mit zwei Oligonukleotiden (1: 17 b lang, 64fach degeneriert, 2: 14 b lang, 32fach deg., siehe 3.2) war es nicht möglich, cDNA-Klone zu identifizieren. Dies schlug fehl, da bei diesen kurzen, hochdegenerierten Oligonukleotiden die Hybridisierstemperatur zu niedrig ist, um unspezifische Hybridisierung der Oligonukleotide zu verhindern. Mit diesen Oligonukleotiden wurde nicht nur in der selbst hergestellten cDNA-Bibliothek in λ gt10 gesucht, sondern nach erfolgloser Suche auch in einer zur Verfügung gestellten HeLa-cDNA- λ gt11-Bibliothek.

Da diese Versuche fehl schlugen, wurden aus der Aminosäuresequenz zwei andere, längere Oligonukleotide abgeleitet (3 und 4, siehe 3.2), die sich nur im Codon für die Aminosäure Arginin (6fach degeneriert) unterscheiden, ansonsten aber die gleiche Aminosäuresequenz codieren.

Mit dem Oligonukleotid 4 (64fach deg., Arg: 5'-AGCT-C-G) ergab die Northernanalyse zwei Transkripte mit 1,4 und 1,9 kb Länge (siehe 3.3). Diese Daten stimmen mit Nagakawa et al. (1987) überein, die einen vollständigen cDNA-Klon zur Hybridisierung an mRNA einsetzten.

Aus der während dieser Versuche veröffentlichten cDNA-Sequenz wurden eindeutige Oligonukleotide abgeleitet, die auch zur Isolierung eingesetzt wurden (5, 6 und 7, siehe 3.2, 3.3 und Abb. 10). Nun läßt sich für die Oligonukleotidsuche nach C3-Klonen vermuten, daß bei der Klonisolierung cDNAs für beide Transkripte isoliert werden. Diese sind jedoch nur nach vollständiger Sequenzierung unterscheidbar, denn die Northernanalyse mit dem degenerierten Oligonukleotid 4 und dem eindeutigen Oligonukleotid 7 ergibt in diesem Zusammenhang für beide Proben mRNAs von 1,4 kb und 1,9 kb Länge. Ein Transkript mit der Länge von etwa 1,0 kb ergab sich hauptsächlich bei der Hybridisierung mit dem Oligonukleotid 3 (32fach deg., Arg: 5'-TC-C-T). Das Oligonukleotid 3 erkennt also eine mRNA, die möglicherweise nicht mit dem hnRNP-Protein C3 in Zusammenhang zu bringen ist, da auch das eindeutige Oligonukleotid 7 nicht mit dieser mRNA hybridisiert.

Aus 300.000 Phagen der cDNA Bibliothek ergab die Suche mit dem Oligonukleotid 4 sechs positive cDNA-Klone, die mit dem

Oligonukleotid 7 21, wobei die ersteren ebenfalls positiv reagierten.

Die Teilsequenzierung des längsten cDNA-Klones (Länge 1,5 kb, siehe 3.7), jeweils von den EcoRI-Klonierungsstellen aus, ergibt eine Homologie zu der bekannten cDNA-Sequenz (siehe 3.7, Swanson et al., 1987), und zwar von 100 % im codierenden 5'-Bereich und eine von 95 % für den nicht translatierten 3'-Bereich.

Ein anderer Aspekt liegt in der engen Verwandtschaft der Proteine C3 und C3X (Werr, 1984, Wilk et al., 1985). Die beschriebenen Antikörper gegen das C3-Protein reagieren ebenfalls mit dem Protein C3X (Choi et al., 1984). Die Molekulargewichtsdifferenz zwischen diesen beiden Proteinen beträgt 2 kD. Dies entspricht etwa 20 Aminosäuren, die C3X länger sein sollte als C3. Möglicherweise könnte das Protein C3X zum größten Teil aus der Aminosäuresequenz C3 bestehen mit einer insertierten Sequenz von 20 Aminosäuren. Mittlerweile konnte gezeigt werden, daß C3X sich durch eine 15 Aminosäure lange Insertion gegenüber C3 unterscheidet (Dreyfuß, persönl. Mitteilung)

Zur Untersuchung, ob die verschieden langen mRNAs nur für ein Protein codieren, oder für beide Proteine gleichlange mRNAs in den Zellen existieren, wurde poly(A')-RNA zu einer "hybrid selection"-Analyse eingesetzt. Der isolierte cDNA-Klon (Swanson et al., 1987), bzw. dessen untranslatiertes 5'-Ende zeigt mit beiden mRNAs eine Hybridisierung. So können diese beiden mRNAs von verwandten Genen transkribiert werden.

Ein besonders gewähltes 3'-DNA-Fragment (150 bp) erkennt in einer Northernanalyse jedoch nur das 1,9 kb lange Transkript. Für ein so über "hybrid selection" isoliertes 1,9 kb-langes Transkript ergibt die in vitro Translation sowohl in einem Kaninchenretikulozyten- wie auch in einem Weizenkeimtranslationsansatz und Immunpräzipitation mit nachfolgender Trennung auf einem SDS-PAA-Gel beide sauren C-Proteine, C3 und C3X.

Für das Ergebnis gibt es zwei Erklärungsmöglichkeiten. Entweder sind sowohl das Retikulozyten- wie auch das Weizenkeimlysat in der Lage, aus dem längeren C3X-Protein das C3-Protein zu prozessieren, oder es gibt zwei 1,9 kb lange

mRNA-Spezies. Im Zusammenhang mit den unten diskutierten Southernergebnissen, die auf mehrere Gene deuten, erscheint die letztere Möglichkeit wahrscheinlicher.

Diese Heterogenität der mRNA wird auch durch "primer extension"-Versuche unterstützt, die zu zwei Banden bei 500 und etwa 600 b Länge führen (siehe 3.4). Hierbei bleibt die Frage, ob die 1,4 kb langen Transkripte nur für C3 oder auch für C3X codieren. Dies würde bedeuten, daß die Abstände zum 5'-Ende der Transkripte sich in ihrer Länge nicht voneinander unterscheiden.

Genaue Aussagen über die einzelnen Transkripte und ihre Codierung können erst weitere Untersuchungen der cDNA- und genomischen Sequenzen ergeben, da erst Angaben über mögliche Exon-Intron-Strukturen wie auch Codierung in möglichen intronlosen Genen Aufschluß über die Transkripte erlauben.

4.5 Genomische DNA

Der isolierte cDNA-Klon für das hnRNP-Protein C3 diente zur Isolierung von genomischen Klonen. Die 60 positiven Klone aus einer 360.000 Phagen umfassenden Bibliothekssuche lassen eine Abschätzung über die Häufigkeit von C3-Sequenzen im Genom zu. In dem Phagen EMBL3 lassen sich 15 kbp klonieren. Die in der genomischen Bibliothek klonierte DNA wurde über partielle Sau3A-Verdauung der genomischen HeLa-DNA erhalten. Bei einer statistischen Länge von 15 kbp Phageninsert, müssen mindestens 200.000 unabhängige Phagen einer genomischen Bibliothek zur Suche eingesetzt werden, um ein Genomäquivalent darzustellen.

Die ausplattierten 360.000 Phagen repräsentieren prinzipiell ca. 1,8 HeLa-Genome. Es ist jedoch zu berücksichtigen, daß es sich um eine amplifizierte Genombibliothek handelt. Da es bei der ersten Plattierung zu Wachstumsunterschieden kommen kann, ist es schwierig, von den 60 isolierten positiven Klonen Rückschlüsse auf die Genzahl/Genom zu ziehen. Unter der Voraussetzung, daß sich keine besonders hohe Verzerrung ergeben hat, wurden 30 Kopien/haploidem Genom gefunden. Diese Zahl ist in Übereinstimmung mit der genomischen Southernanalyse, bei der multiple Banden nachzuweisen sind

In einer genomischen Southernanalyse ergibt die Hybridisierung des isolierten cDNA-Klons gegen die restringierte HeLa-DNA unterschiedliche Bandenzahlen (BamHI 4, EcoRI 11 und HindIII 12, siehe Abb. 11). Dies spricht für eine Genfamilie, da ein einzelnes Gen weit weniger Banden ergeben sollte. Analoge Ergebnisse erhalten auch Nagagawa et al. (1986). Die Transkriptanalyse weist mit ihren zwei mRNAs für C3 auch auf eine Genfamilie hin, da bei unterschiedlichen Transkripten ebenso unterschiedliche Gene für diese codieren sollten.

Die Suche nach funktionellen, exprimierten genomischen Sequenzen wird dadurch nicht erleichtert. Es wurde versucht, die isolierten genomischen Klone anhand ihrer Hybridisierung gegen die verschiedenen Oligonukleotide näher zu charakterisieren.

Die erhaltenen Hybridisierungsdaten für die genomischen Klone ergeben DNA-Bereiche, die den kompletten, codierenden Bereich enthalten (Tab. 4). Diese 8 Klone hybridisieren mit den N- und C-terminal in der Proteinsequenz liegenden Oligonukleotiden (5, 7) und dem in der Mitte liegenden Oligonukleotid 6. Weiterhin hybridisieren 7 Klone mit dem N-terminalen Oligonukleotid sowie mit einem in der Mitte liegenden (Oligonukleotid 6). 7 Klone zeigen positive Hybridisierung mit den Oligonukleotiden 4 und 5, die in der Proteinsequenz die Mitte repräsentieren, und dem C-terminalen Oligonukleotid 7. Die übrigen Klone zeigen eine Hybridisierung, die darauf schließen läßt, daß sie die der Proteinsequenz entsprechende DNA-Sequenz nur teilweise codieren.

Aufgrund dieser Daten wurde der Klon (λ gHW14) näher charakterisiert. Ein BamHI-DNA-Fragment wurde zur weiteren Sequenzierung ausgewählt, da es mit allen Oligonukleotiden hybridisierte. Der Sequenzvergleich (siehe 3.11 und Abb. 16) mit dem veröffentlichten cDNA-Klon (Swanson et al., 1987) ergibt einen hohen Grad an Homologie. Neben einzelnen Basenaustauschen ist in der Sequenz ein Stoppcodon zu finden. Der mögliche Leserahmen ist über weite Bereiche homolog zu dem C3-cDNA-Klon.

Im 5'-Bereich des näher untersuchten genomischen Fragmentes ist eine CAAT- und TATA-Box ähnliche Sequenz zu finden. Aus diesem Grunde wurde dieser Bereich in ein Plasmid ligiert,

das ein CAT-Gen enthielt. Die Bestimmung der CAT-Aktivität ergab jedoch keinen aktiven Promotor. Es kann nicht ausgeschlossen werden, daß der 5'-Bereich zu kurz ist, um einen Promotor darzustellen. Vor der vermeintlichen CAAT-Box befinden sich noch 130 bp stromaufwärts. Weiter vorne liegende Kontrollbereiche für einen aktiven Promoter fehlen in diesem Konstrukt.

Direkte Wiederholungen von 11 Basen (GAGGAAAAAAAA) am 5'- und 3'-Ende des möglichen Gens in der genomischen Sequenz gegenüber dem cDNA-Klon könnten für ein Pseudogen sprechen, das im Laufe der Evolution über eine reverse Transkription von mRNA und nachfolgende Reintegration in das Genom gelangte. Die Lage der 5'-Wiederholung stimmt mit dem möglichen Ende des Transkriptes, wie aus den "primer extension"-Versuchen abzuleiten ist (siehe 3.4), überein. Weiterhin fehlen Intronsequenzen, falls in einem aktiven Gen solche vorhanden sein sollten. Es könnte sich also um ein Pseudogen handeln ("Retroposon").

Für die Histongene ist bekannt, daß sie keine Introns enthalten, und die mRNA nicht polyadenyliert wird (Sittman et al., 1983, Heintz et al., 1984). Diese häufig benötigten Proteine werden also direkt, ohne erforderliche Spleißvorgänge der RNA in der Zelle synthetisiert. Für den Spleißvorgang ist die Anwesenheit des hnRNP-Proteins C3 essentiell. Das heißt, daß das Protein für diesen Prozeß in der Zelle vorhanden sein muß. Es sollten also im Genom Sequenzen für dieses Protein vorhanden sein, die intronlos für eine sofortige Expression des Proteins der Zelle zur Verfügung stehen. Ist der Spleißvorgang einmal ermöglicht worden, können auch intronhaltige C3-Gene exprimiert werden. Die intronlosen Gene könnten zu diesem Zeitpunkt abgeschaltet werden. Dies könnte zum Beispiel für die zwei Transkripte in einer Northernanalyse sprechen. Unsynchronisierte Zellen teilen sich unterschiedlich, und nach der Mitose könnte es erforderlich sein, zuerst intronlose Gene für einen nachfolgenden effizienteren Prozessierungsapparat zu exprimieren. Also sollten verschiedene Transkripte in den Zellen einer unsynchronisierten Kultur nachweisbar sein.

Der genomische Klon λ gHW 14 wurde ausgewählt, weil er es möglich erscheinen ließ, ein intronloses Gen darzustellen

Die Hybridisierungsdaten mit den Oligonukleotiden sprachen für dieses Verhalten. Eine nicht zu beantwortende Frage bleibt, ob das Protein C3 in intronlosen Genen codiert wird, oder ob auch intronhaltige existieren, und wenn dem so ist, wie die reife mRNA gebildet wird.

Im ersteren Fall stellt das beschriebene DNA-Fragment einen genomischen Bereich dar, der sich vielleicht über einen Translokationsvorgang mit nachfolgend häufiger Mutation entwickelt hat. Im zweiten Fall kann nur eine Reintegration einer revers transkribierten, prozessierten mRNA als Ursprung für dieses Fragment angenommen werden.

5 Literatur

- Appleyard, P.K., Genetics 39, 440-452 (1954), Segregation of new lysogenic types during growth of a double lysogenic strain derived from *Escherichia coli*
- Baumann, A., Dissertation Ruhr-Universität Bochum (1986), Klonierung des shaker-Komplexes von *Drosophila melanogaster*
- Benton, W.D., R.W. Davis, Science, 196, 180-182 (1977), Screening of gt10 recombinant clones by hybridization to single plaques in situ
- Beyer, A.L., M.E. Christensen, B.W. Walker, W.M. LeStourgeon, Cell 11, 127-138 (1977), Identification and characterization of the packaging proteins of core 40S hnRNP particles
- Beyer, A.L., O.L. Miller, Jr., S.T. McKnight, Cell, 20, 75-84 (1980), Ribonucleoprotein structure in nascent hnRNA is nonrandom and sequence-dependent
- Beyreuther, K., B. Bieseler, J. Bovens, R. Dildrop, K. Neifer, K. Stüber, S. Zaiss, R. Ehring, P. Zabel, Modern Methods in Protein Chemistry, H. Tschesche (ed.), Walter de Gruyter, 1983. Microsequence analysis of peptides and proteins
- Billings, P.B., T.E. Martin, Meth. Cell Biol. 17, 349-376 (1978), Proteins of nuclear ribonucleoprotein complexes
- Bindereif, A., M.R. Green, EMBO J. 6, 2415-2424 (1987), An ordered pathway of snRNP binding during mammalian pre-mRNA splicing complex assembly
- Bindereif, A., M.R. Green, Mol. Cell. Biol. 6, 2582-2592 (1986), Ribonucleoprotein complex formation during pre-mRNA splicing in vitro
- Birnstiel, M.L., M. Busslinger, K. Strub, Cell 4, 349-359 (1985), Transkription termination and 3'-processing: the end is in site!
- Breathnach, R., J.L. Mandel, P. Chambon, Nature 270, 314-319 (1977), Ovalbumin gene is split in chicken DNA
- Breathnach, R., p. Chambon, Ann. Rev. Biochem. 50, 349-383 (1981), Organization and expression of eucaryotic split genes coding for proteins
- Buvoli, M., G. Biamonti, P. Tsouflas, M.T. Bassi, A. Ghetti, Riva, C. Morandi, Nuclei. Acid. Res. 16, 3751-3770 (1988), cDNA cloning of human hnRNP protein A1 reveals the existence of multiple mRNA isoforms
- Celis, J.E., R. Bravo, H.P. Arensdorf, W.M. LeStourgeon, FEBS Letters, 194, 101-109 (1986), Identification of proliferative-sensitive human proteins amongst components of the 40S hnRNP particles

- Chase, J.W., K.R. Williams, *Ann. Rev. Biochem.* 55, 103-156 (1986), Single-strand DNA binding proteins required for DNA replication
- Choi, Y.D., G. Dreyfuss, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 7471-7475 (1984), Isolation of the heterogenous nuclear RNA-ribonucleoprotein complex (hnRNP): a unique supramolecular assembly
- Choi, Y.D., G. Dreyfuss, *J. Cell Biol.* 99, 1997-2004 (1984), Monoclonal antibody characterization of the C proteins of heterogenous nuclear ribonucleoprotein complexes in vertebrate cells
- Choi, Y.D., P.J. Grabowski, P.A. Sharp, G. Dreyfuss, *Science* 231, 1534-1539 (1986), Heterogenous nuclear ribonucleoproteins: role in RNA splicing
- Cleveland, D.W., S.G. Fischer, M.W. Kirschner, U.K. Laemmli, *J. Biol. Chem.* 252, 1102-1106 (1977), Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecylsulfate and analysis by gel electrophoresis
- Cobianchi, F., D.N. SenGupta, B.Z. Zmudzka, S.H. Wilson, *J. Biol. Chem.*, 261, 3536-3543 (1986), Structure of rodent helix-destabilizing protein by cDNA cloning
- Coppola, J.A., A.S. Field, D.S. Lube, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 1251-1255 (1983), Promoter-proximal pausing by RNA polymerase II in vitro: transcripts shorter than 20 nucleotides are not capped
- Darnell, J.E., Jr., *Nature* 297, 365-371 (1982), Variety in the level of gene control in eucaryotic cells
- Davis, L.G., M.D. Dibner, J.F. Battey, Elsevier (1986), *Basic Methods in Molecular Biology*
- Dreyfuss, G., Y.D. Choi, S.A. Adam, *Mol. Cell. Biol.* 4, 1104-1114 (1984), Characterization of heterogenous nuclear RNA-protein complexes in vivo with monoclonal antibodies
- Dreyfuss, G., *Ann. Rev. Cell. Biochem.*, 2, 459-498 (1986), Structure and function of nuclear and cytoplasmic ribonucleoprotein particles
- Dreyfuss, G., M.S. Swanson, S. Piñol-Roma, *TIBS* 13, 86-91 (1988), Heterogenous nuclear ribonucleoprotein particles and the pathway of mRNA formation
- Economidis, I.V., T. Pederson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 1599-1602 (1983), Structure of nuclear ribonucleoprotein: heterogenous nuclear RNA is complexed with a major sextet of proteins in vivo
- Enquist, L., N. Sternberg, *Methods Enzym.* 68, 281-298 (1979), In vitro packaging of dam vectors and their use in cloning DNA fragments

- Feinberg, A.P., B. Vogelstein, *Anal. Biochem.* 132, 6-13 (1983), A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity
- Gabaldon de Koch, I., *Dissertation Ruhr-Universität Bochum* (1983), Untersuchungen an nuklearen Ribonukleoprotein-Komplexen aus Rinder-Lymphozyten
- Gorman, C.M., L.F. Moffat, B.H. Howard, *Mol. Cell. Biol.* 2, 1044-1051 (1982), Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyltransferase in mammalian cells
- Gorman, C., in *DNA cloning Vol. II*, Glover, D.M., (ed.) IRL Press Oxford (1985), High efficiency gene transfer into mammalian cells
- Grabowski, P.J., P.A. Sharp, *Science* 233, 1294-1299 (1986), Affinity chromatography of splicing complexes: U2, U5, and U4+U6 small nuclear ribonucleoprotein particles in the spliceosome
- Graham, F., A. van der Eb, *Virology* 52, 456-467 (1973), A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA
- Gubler, U., B.J. Hoffman, *Gene* 25, 263-269 (1983), A simple and very efficient method for generating cDNA-libraries
- Heintz, N., R.G. Roeder, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 2713-2717 (1984), Transcription of human histone genes in extracts from synchronized HeLa cells
- Hewick, R.M., M.W. Hunkapiller, L.E. Hood, W.J. Dreyer, *J. Biol. Chem.* 256, 7990-7997 (1981), A gas-liquid solid phase peptide and protein sequenator
- Hohn, B., *Methods Enzym.* 68, 299-309 (1979), In vitro packaging of λ and cosmid DNA
- Hunkapiller, M.W., E. Lujan, F. Ostrander, L.E. Hood, *Meth. Enzym.* 91, 227-236 (1983), Isolation of microgram quantities of proteins from polyacrylamide gels for amino acid sequence analysis
- Huynh, T.V., R.A. Young, R.W. Davis in *DNA-Cloning Vol I.* Glover, D.M., (ed.) IRL Press Oxford p 49-78 (1985), Construction and screening cDNA libraries in λ gt10 and λ gt11
- Isenberg, I., *Ann. Rev. Biochem.* 48, 159-191 (1979), Histones
- Kaiser, K., N.E. Murray in *DNA-Cloning Vol I.* Glover, D.M., (ed.) IRL Press Oxford p 1-47 (1985), The use of phage lambda replacement vectors in the construction of representative genomic DNA libraries
- Karn, J., G. Vidal, L.C. Boffa, V.C. Allfrey, *J. Biol. Chem.* 252, 7307-7322 (1977), Characterization of the non-histone nuclear proteins associated with rapidly labeled heterogeneous nuclear RNA

Kumar, A., K.R. Williams, W. Szer, J. Biol. Chem. 261, 11266-11273 (1986), Purification and domain structure of core hnRNP proteins A1 and A2 and their relationship to single-strand DNA-binding proteins

Kumar, A., H. Sierakowska, W. Szer, J. Biol. Chem. 262, 17126-17137 (1987), Purification and RNA binding properties of a C-type hnRNP protein from HeLa cells

Laemmli, U.K., Nature 227, 680-685 (1970), Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4

Lahiri, D.K., J.O. Thomas., J. Biol. Chem. 260, 598-603 (1985), The fate of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein complexes during mitosis

Lahiri, D.T., J.O. Thomas, Nucl. Acid Res. 14, 4077-4093 (1986), A cDNA clone of the hnRNP C proteins and its homology with the single strand-stranded DNA binding protein UP2

Lopata, M.A., D.W. Cleveland, B. Sollner-Webb, Nucl. Acid Res. 12, 5707-5717 (1984), High level transient expression of a chloramphenicol acetyl transferase gene by DEAE-dextran mediated DNA transfection coupled with a dimethyl sulfoxide or glycerol shock treatment

Laskey, R.A., A.D. Mills, Eur. J. Biochem. 56, 335-341 (1975), Quantitative film detection of ^3H and ^{14}C in polyacrylamide gels by fluorography

Leser, G.P., J. Escera-Wilke, T.E. Martin, J. Biol. Chem. 259, 1827-1833 (1984), Monoclonal antibodies to heterogeneous nuclear RNA-protein complexes

LeStourgeon, W.M., A.L. Beyer, M.E. Christensen, B.W. Walker, S.M. Pourpore, L.P. Daniels, Cold spring Harbor Symp. Quant. Biol. 42, 885-898 (1978), The packaging proteins of core hnRNP particles and the maintenance of proliferative cell states

LeStourgeon, W.M., L. Lohstein, B.W. Walker, A.L. Beyer, in The Cell Nucleus, H. Busch (ed.), 9, 49-87 (1981), The composition and general topology of the RNA and protein in monomer 40s hnRNP particles

Lothstein, L., H.P. Arenstorf, S.-Y. Chung, B.W. Walker, J.C. Wooley, W.M. LeStourgeon, J. Cell Biol. 100, 1570-1581 (1985), General organization of protein in HeLa 40S nuclear ribonucleoprotein particles

Merril, B.M., M.B. LoPresti, K.L. Stone, K.R. Williams, J. Biol. Chem., 261, 878-883 (1986), High pressure liquid chromatography of UP1 and UP2, two related single-stranded nucleic acid-binding proteins from calf thymus

Maniatis, T., E.F. Fritsch, J. Sambrook, Cold Spring Harbor Laboratory (1982), Molecular cloning

Maniatis, T., R. Reed, *Nature* 325, 673-678 (1987), The role of small ribonucleoprotein particles in pre-mRNA splicing

Martin, T., P. Billings, J. Pullman, B. Stevens, A. Kin-niburgh, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 42, 899-909 (1978), Substructure of nuclear ribonucleoprotein complexes

Matteucci, M.D., M.H. Caruthers, *J. Am. Chem. Soc.* 103, 3185-3191 (1981), Synthesis of deoxynucleotides on a polymer support

Mayrand, S., T. Pederson, *Mol. Cell. Biol.* 3, 161-171 (1983), Heat shock alters nuclear ribonucleoprotein assembly in *Drosophila* cells

Mayrand, S.H., N. Pedersen, T. Pederson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 3718-3722 (1986), Identification of proteins that bind tightly to pre-mRNA during in vitro splicing

Melchers, K., Dissertation Ruhr-Universität Bochum (1987), Vergleichende Untersuchungen zur Organisation, Struktur und Expression hnRNP-core Protein A1 spezifischer Gene

Messing, J., *Methods Enzymol.* 101, 20-78 (1983), New M13 vectors for cloning

Miyada, C.G., R.B. Wallace, *Methods in Enzymology* 154, 94-107 (1987), Oligonucleotide hybridization technique

Nakagawa, T.Y., M.S. Swanson, B.J. Wold, G. Dreyfuss, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 2007-2011 (1986), Molecular cloning of cDNA for the nuclear ribonucleoprotein particle C proteins: a conserved gene family

O'Farrell, P.Z., H.W. Goodman, P.H. O'Farrell, *Cell* 12, 1133-1141 (1977), High resolution two dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins

Ostheim, Y.N., O.L. Miller, Jr., A.L. Beyer, *Cell* 43, 143-151 (1985), RNP particles at splice junction sequences on *Drosophila* chorion transcripts

Padgett, R.A., P.J. Grabowski, M.M. Konarska, S. Seiler, P.A. Sharp, *Ann. Rev. Biochem.* 55, 1119-1150 (1986), Splicing of messenger RNA precursors

Pandolfo, M., O. Valentini, G. Biamonti, C. Morandi, S. Riva, *Nucl. Acid Res.* 13, 6577-6590 (1985), Single strand DNA binding proteins derive from hnRNP proteins by proteolysis in mammalian cells

Pandolfo, M., O. Valentini, G. Biamonti, P. Rossi, S. Riva, *Eur. J. Biochem.* 162, 213-220 (1987), Large-scale purification of hnRNP proteins from HeLa cells by affinity chromatography on ssDNA-cellulose

Peters, K.E., D.E. Comings, *J. Cell. Biol.* 86, 135-155 (1980), Two-dimensional gel electrophoresis of rat liver

nuclear washes, nuclear matrix, and hnRNA proteins

Pullman, J. M., T. E. Martin, J. Cell Biol. 97, 99-111 (1983), Reconstitution of nucleoprotein complexes with mammalian heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) core proteins

Piñol-Roma, S., Y. D. Choi, M. J. Matunis, G. Dreyfuss, Genes & Development, 2, 215-227 (1988), Immunoprecipitation of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein particles reveals an assortment of RNA-binding proteins

Rothe, H., Diplomarbeit Ruhr-Universität Bochum (1985), Charakterisierung genomischer β -Actin- und β -Tubulin-Klone des Rindes

Queen, C., L. Korn, Nucl. Acid. Res. 12, 581-599 (1984), A comprehensive sequence analysis program for the IBM personal computer

Riva, S., C. Morandi, P. Tsoulfas, M. Pandolfo, G. Biamonti, B. Merrill, K. R. Williams, G. Multhaup, K. Beyreuther, H. Werr, B. Henrich, K. P. Schäfer, EMBO J. 5, 2267-2273 (1986), Mammalian single-strand DNA binding protein UPI is derived from the hnRNP protein A1

Rosenberg, S. M., M. M. Stahl, I. Kobayashi, F. W. Stahl, Gene, 38, 165-175 (1985), Improved in vitro packaging of coliphage lamda DNA: a one-strain system free from endogeneous phage

Samarina, O. P., A. A. Kricheskaya, G. P. Georgiev, Nature 210, 1319-1322 (1966), Nuclear ribonucleoprotein particles containing messenger ribonucleic acid

Samarina, O. P., E. M. Lukanidin, J. Molnar, G. P. Georgiev, J. Mol. Biol. 33, 251-263 (1968), Structural organization of nuclear complexes containing DNA-like RNA

Sanger, F., S. Nicklen, A. R. Coulson, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467 (1977), Sequencing with chain terminating inhibitors

Setterfield, G., R. Hall, T. Bladon, J. Little, J. Kaplan, J. Ultrastruct. Res. 257, 2305-2309 (1982), Changes in structure and composition of lymphocyte nuclei during mitogenic stimulation

Sharp, P. A., Science 235, 766-771 (1987), Splicing of messenger RNA precursors

Shatkin, A. J., Cell 9, 645-653 (1976), Capping of eucaryotic mRNAs

Sierakowska, H., W. Szer, P. J. Furdon, R. Kole, Nucl. Acid Res. 14, 5241-5254, Antibodies to hnRNP core proteins inhibit in vitro splicing of human β -globin pre-mRNA

Sinha, N. D., J. Biernat, J. McManus, H. Köster, Nucl. Acid Res. 12, 4539-4557 (1984), Polymer support oligonucleotide synthesis XVIII: use of β -cyanoethyl-N,N-dialkylamino/N-

morpholino phosphoramidite of deoxynucleotides for the synthesis of DNA fragments simplifying deprotection and isolation of the final product

Sittman, B.D., R.A. Reed, W.F. Marzluff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 1849-1853 (1983), Histone mRNA concentrations are regulated at the level of transcription and mRNA degradation

Southern, E., J. Mol. Biol. 98, 503-517 (1975), Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis

Spandidos, D.A., N.M. Wilkie, in Transcription and translation, B.D. Hames, S.J. Higgins (eds.), IRL Press Oxford (1984), Expression of exogenous DNA in mammalian cells

Sperling, R., P. Spann, D. Offen, J. Sperling, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 6721-6725 (1986), U1, U2 and U6 small ribonucleoproteins (snRNPs) are associated with large nuclear RNP particles containing transcripts of an amplified gene in vivo

Strauss, E. C., J.A. Kobori, G. Siu, L.E. Hood, Anal. Biochem. 154, 353-360 (1986), Specific-primer-directed DNA sequencing

Suria, D., C.C. Liew, Can. J. Biochem. 57, 32-42 (1979), Characterization of proteins associated with nuclear ribonucleoprotein particles by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis

Swanson, M.S., T.Y. Nakagawa, K. LeVan, G. Dreyfuss, Mol. Cell. Biol. 7, 1731-1739 (1987), Primary structure of human nuclear ribonucleoprotein particle C proteins: conservation of sequence and domain structures in heterogeneous nuclear RNA, mRNA and pre-rRNA-binding proteins

Tautz, D., M. Renz, Anal. Biochem. 132, 14-19 (1983), An optimized freeze-squeeze method for the recovery of DNA fragments from agarose gels

Valentini, O., G. Biamonti, M. Pandolfo, C. Morandi, S. Riva, Nucl. Acid Res. 13, 337-346 (1985), Mammalian single-strand binding proteins and heterogeneous nuclear RNA proteins have common antigenic determinants

van Eekelen, C.A.G., W. van Venrooij, J. Cell Biol. 88, 554-563 (1981), HnRNA and its attachment to a nuclear protein matrix

van Eekelen, C., R. Ohlsson, L. Philipson, E. Mariman, R. van Beek, W. van Venrooij, Nucl. Acid Res. 10, 7115-7131 (1982), Sequence dependent interaction of hnRNP proteins with late adenoviral transcripts

Vanin, E.F., Ann. Rev. Genet. 19, 253-272 (1985), Processed pseudogenes: characteristics and evolution

Verheijen, R., W. van Venrooij, F. Ramsekers, J. Cell Science, 90, 11-36 (1988), The nuclear matrix: structure and composition

Weiner, A.M., P.L. Deininger, A. Efstratiadis, Ann. Rev. Biochemn. 55, 631-661 (1986), Nonviral retroposons: genes, pseudogenes, and transposable elements generated by the reverse flow of genetic information

Werr, H., Diplomarbeit Ruhr-Universität Bochum (1984), Untersuchungen an den hnRNP-Proteinen der A- und C-Gruppe aus HeLa-Zellen

Williams, K.R., K.L. Stone, M.B. LoPresti, B.M. Merrill, S.R. Planck, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 5666-5670 (1985), Amino acid sequence of the UPI calf thymus helix-destabilizing protein and its homology to an analogous protein from mouse myeloma

Wilk, H.-E., G. Angeli, K.P. Schäfer, Biochem. 22, 4592-4600 (1983), In vitro reconstitution of 35S ribonucleoproteincomplexes

Wilk, H.-E., H. Werr, D. Friedrich, H.H. Kiltz, K.P. Schäfer, Eur. J. Biochem. 146, 71-81 (1985), The core proteins of 35S hnRNP complexes

Wilk, H.E., Dissertation Ruhr-Universität Bochum 1984, Untersuchungen zu Struktur und Funktion von Ribonukleoproteinkomplexen in Säugetierzellen

Yanish-Perron, C., J. Vieira, J. Messing, Gene 33, 103-119 (1985), Improved M13 phage cloning vectors and host strain: nucleotide sequence of M13mp18 and M13mp19

Young, R.A., R.W. Davis, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 1194-1198 (1983, a), Efficient isolation of genes by using antibody probes

Young, R.A., R.W. Davis, Science 222, 778-782 (1983, b), Yeast RNA polymerase ii genes: isolation with antibody probes

Anhang

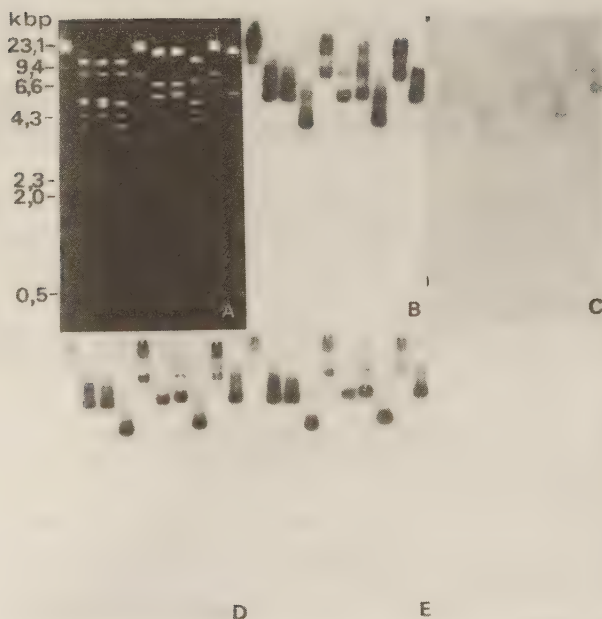


Abb. 19:

Hybridisierung von markierter cDNA und den Oligonukleotiden 4, 5 und 7 an den Klon λ gHW 19

Die DNA-Fragmente des Klon λ gHW 19 wurde nach Restriktion mit verschiedenen Endonukleasen auf einem 0,6%igen Agarosegel getrennt und auf Nylonmembranen transferiert. Die Hybridisierung erfolgte analog 2.12. Die unspezifisch gebundenen Fragmente der Hybridisierung gegen die cDNA wurden mit 0,2xSSC, 0,1 % SDS (w/v) von der Membran eluiert, die anschließende Autoradiographie erfolgte für 45 min. Das nicht hybridisierte Oligonukleotid 4 wurde mit 6xSSC, 0,1 % SDS (w/v) von der Membran eluiert. Die Autoradiographie erfolgte über Nacht. Für die Oligonukleotide 5, 6 und 7 wurde die Membran mit 2xSSC, 0,1 % SDS (w/v) gewaschen und für 10h autoradiographiert.

Gelbahn

1	Restriktion mit Sali	A	Agarosegel
2	Restriktion mit Sali/BamHI	B	Hybridisierung gegen oligomarkierte cDNA
3	Restriktion mit BamHI	C	Hybridisierung gegen Oligonukleotid 5
4	Restriktion mit BamHI/EcoRI	D	Hybridisierung gegen Oligonukleotid 4
5	Restriktion mit EcoRI	E	Hybridisierung gegen Oligonukleotid 7
6	Restriktion mit EcoRI/HindIII		
7	Restriktion mit HindIII		
8	Restriktion mit HindIII/BamHI		
9	Restriktion mit EcoRI/Sali		
10	Restriktion mit HindIII/Sali		

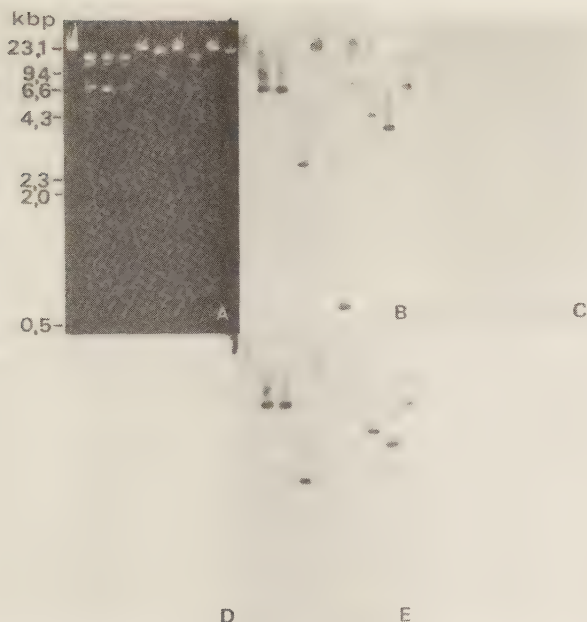


Abb. 20:

Hybridisierung von markierter cDNA und den Oligonukleotiden 4, 5 und 7 an den Klon λ gEW 31

Die DNA-Fragmente des Klon λ gEW 31 wurde nach Restriktion mit verschiedenen Endonukleasen auf einem 0,6%igen Agarosegel getrennt und auf Nylonmembranen transferiert. Die Hybridisierung erfolgte analog 2.12. Die unspezifisch gebundenen Fragmente der Hybridisierung gegen die cDNA wurden mit 0,2xSSC, 0,1 % SDS (w/v) von der Membran eluiert, die anschließende Autoradiographie erfolgte für 45 min. Das nicht hybridisierte Oligonukleotid 4 wurde mit 6xSSC, 0,1 % SDS (w/v) von der Membran eluiert. Die Autoradiographie erfolgte über Nacht. Für die Oligonukleotide 5, 6 und 7 wurde die Membran mit 2xSSC, 0,1 % SDS (w/v) gewaschen und für 10h autoradiographiert.

Gelbahn

1	Restriktion mit SalI	A	Agarosegel
2	Restriktion mit SalI/BamHI	B	Hybridisierung gegen oligomarkierte cDNA
3	Restriktion mit BamHI	C	Hybridisierung gegen Oligonukleotid 5
4	Restriktion mit BamHI/EcoRI	D	Hybridisierung gegen Oligonukleotid 4
5	Restriktion mit EcoRI	E	Hybridisierung gegen Oligonukleotid 7
6	Restriktion mit EcoRI/HindIII		
7	Restriktion mit HindIII		
8	Restriktion mit HindIII/BamHI		
9	Restriktion mit EcoRI/SalI		
10	Restriktion mit HindIII/SalI		

Teilsequenz des genomischen Klon λ gHW14

```

60
GGATCCTGCC TGGTGTTACC TGCCTCTGGC TCCCCTGAAC CCCTCAGGTA GAGGTTCTGA
120
GGGTCCCATC TATATATTAC AGCCTATCCC TGTTCAGAG CCAATTGGA AGGAGACAGA
180
GGTGAGAAGC AGCCTCAATC CTGTAGACTT ATGGGGCCAC AGGAACTATT TCTGTAATAT
240
CATTGCATCC TGGGACCTGA TAGCCCAGCC AGGATGCTGT CATCTACTTG GAAGCCATGG
300
AGATGTGACC AGGGAAGCTG GGTCAAGTCC AGCTCAGGGA TGGTGGTGTT TATCTGGAGT
360
GACAAGATGT TACACAGGTG AGGAAAAAAAA CCTACTATTG ATTTTTTTGT GAAGAGACGA
420
AGACTGAGTG GTTGTGGCCG TGTGGTGAC CTTGAGCAGC AGTTGGCTTC TCCATGTAGA
480
ACCCGGGAGA GGAGACTCAG AATCGAATCT CTTCTCCCTC CCCCTCCTGT TTTCAGCTTT
540
GTGAGAAACC TTATCAGCAA ACACAATGGC CAGCAACGTT ACCAACAAGA CAAATCCTTG
600
CTCCATGAAC TCCCATGTGT TCATTGGGAA TCTCAACACT CTTGTGGTCA AGAAATCTGA
660
TGTGGAGGCA ATCTTTTCGA AGTATGGCAA AATGGGCTGT GCTGTTTATA AGGGCTTTTG
720
CTTTGTTCAA TATTTTAGTG AGAGAAATGC CCGGGCTGCT GGAGCAGGAG AGGATGATAG
780
AATGATTGCT GGCCAGGTTT TAGATATTAA CCTGGCTGCA GAGCCAAAAG TGAACCGTGG
840
AAAAGCAGGC GTGAAACGAT CTGCAGTGGA GATGTATAGC TCCTCTTTTC ACTTGGGCTA
900
TGA CTATCAA GGTGATTATG ATGACACGAT GTACAGTTAC TCAGCACGTG TGCTCCTCC
960
TCCTCCTATT GCTTGGGCTG TAGTGCTCTC AAAACGTCAG CGTGATCAG GAAACACCTC
1020
ATGAAGGGGC AAAAGTGGCC TCAATTCTAA GAGTGGACAG CAGGGATCTT CCAAGTCTGG
1080
AAAGTTGAGA GGAGATGACC TTCAGGCCAT TATGAAGGAG TTGACCCAGA TAAAACAAAA

```

AGTGGATTCT CTCCTGAAAA ACCTGAAAAA AATTGAAAAG GAACAGAGCA AACACGCAGT 1140
 AGAGATGAGG AATGATAAGT CAGAAGAGGA GCAGAGCAGC AGCTCCGTGA AAAAGATGAG 1200
 ACTAATGTGA AGATGGAGTC TGAGGGGCGT GCAGATGACT GTGCTGAGAA GGGGGACCTA 1260
 CTGGATGATG ATGATAATGA GGATGGGGGG ATGACCAGCT GGAGTTGATC AAGGATGATG 1320
 AAAAAAGAGGC TGAGGAAGGA GAGGATGACA GAGACAGCAC CAATGGCATG GATGACTCTT 1380
 AAGCACATAG TGGGTTTAGA AATCTTATTC CATTATTTCT TTACCTAGGC ACTTGTCTAA 1440
 GATCAAATTT TTCACCAGAG CTCTCACCTA GATCTTTTG CACATGCTCA CTGTCCTTCC 1500
 CATCCTTGTC CTTCCCATGT TTATTAATTC ATATTGCCCT GCGCCTAGTC CCATTTTCAC 1560
 TTCCTTTGGC ACTCTTAGTA GTTTTGTAA GTCTTACCTT GTAATATTTG CTTTAAATTT 1620
 TGATACCTCT TTATGACTTA ATAAAAAGGA TGTATGGTTT TTATCAACTG TCTCCAAAAT 1680
 AATCTCTTGT TATGCAGGGA GGACAGTTCT TTTCAATCAT ACATAAGTTC AGTAGTTGCT 1740
 TCCCTGACTG CAAAGGCAAG CTTATTTAGT TGAGTAGCTC CTGAAAGCAG CTTTGATTAG 1800
 AAGTATGTGT GTTACACCCC CACATTAGTG TGCTGTGTGG GGCAGTTCAA CACAAATGTA 1860
 ACAATGTATT TTTGTGAATG AGAGTTGGCA TGTCAAATGC ATCCTCTAGA AAAATAATGA 1920
 GTGTTATAGT CTTAAGATTT GTTTTCTAAA GTTGATACTG TGTGTTATTT TTGTGAACAG 1980
 CTTGATGTTT GGGAACTTTT TTTCTCAAA ATAAACAGGT CTTATTAAA CCAGGAATTT 2040
 GGAGGAAAAA AAAACCCTGT TTTTTAAATT TTTGTATTTT ATTATTGTTT ACTTCAAAC 2100
 CTTTGTTTTT CAGAGTCCTC CACAAAACCC CCAGAACGTA CTAGATATAT TTTTCTTGAA 2160

2220
 GTCATAATCA TTATGCATAC CAACATAACA CTA CTCAAAT TCTATTTTCAT TGAGATGCAT
 2280
 GTTGCAATTGA GGAGTCAAAT AACTTGACAG AGAGTGGAGA TTGTTTTTCA AAATGGCTTT
 2340
 TACATCCTAA TGAAAGTTTG GGAAGTATAG CCTCTCTGCC TTTTCATCAG TGCTTTGTGG
 2400
 TCCAGCTGGC ACCTTTTTTG AAGTTTTTGT TGTGTGCTAA ATTGTTTTGT CTTTAAATAG
 2460
 GAGAGGCTCA AAAACATTAA GATTTTCAGGA AAATTGCAAC AGCTGGAAAA TGGAACCCCT
 2520
 GCTTTCTTCT ATTTTGTCTT TTTAATTACT ATTTATAGCC ACAGTTACCT TCTGAATTCT
 2580
 GAAGTGTTAC CTCAATGTTA CTGAAAACAA GAAAATTCTT ATTTCTGAT ATTCCATAGT
 2640
 CTGCCTTCCC AGGTGATTGA GAACATAGAG AATGTTACAC ATTTATTTTA CCCTAAATAA
 2700
 TCTTTTACTC ATATTAGCTA ATCTTTGTGT TTTCTCTCAA CTTTATTAAT TGCAGTGATT
 2760
 GCATTTTITAG CATCCAGTCT TCTTAAGATG AATACATTAA ATAGCTACCA GTGTTGTGAT
 2820
 ACCTCATCCT TGAAAGGCCT AGTTCATTTG TGTTTTATGC TTCAGTTTTT CCAGCACAGC
 2880
 AGAAAATGGC ATTTATAATT TTTGTGCACA CAAACCTTGG ATTCCCCTCA TAGAAGTATG
 2896
 TCTATTGTTT CTATAG

Lebenslauf

27. 8. 1958	geboren in Köln
1964 - 1968	Besuch der Grundschule in Köln
1968 - 1978	Besuch des Städt. Gymnasiums Köln-Nippes
16. 5. 1978	Erlangung der Allg. Hochschulreife
1978 - 1984	Studium der Chemie an der Ruhr-Universität Bochum
1983 - 1984	Diplomarbeit am Lehrstuhl für Biochemie bei Prof. Dr. K. P. Schäfer
29. 5. 1984	Diplom im Fach Chemie
1984 - 1988	Promotion am Lehrstuhl für Biochemie bei Prof. Dr. K. P. Schäfer

Veröffentlichungen:

Wilk, H.-E., H. Werr, D. Friedrich, H.H. Kiltz, K.P. Schäfer, Eur. J. Biochem. 146, 71-81 (1985)

Riva, S., C. Morandi, P. Tsoulfas, M. Pandolfo, G. Biamonti, B. Merrill, K.R. Williams, G. Multhaup, K. Beyreuther, H. Werr, B. Henrich, K.P. Schäfer, EMBO J. 5, 2267-2273 (1986)

